

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”

**Dottorato di Ricerca in Agrobiologia e
Agrochimica
XXV Ciclo**

INDIRIZZO ENTOMOLOGIA E ZOOLOGIA AGRARIA

***Studio di geni candidati utili per il controllo di organismi
dannosi per le piante***

Tutore:

Ch.mo Prof. Rosa Rao

Candidato:

Roberta Calafiore

Co-Tutore

Ch.mo Prof. Francesco Pennacchio

Dott.ssa Michelina Ruocco

Coordinatore

Ch.mo Prof. Matteo Lorito

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

1 INTRODUZIONE	1
<u>1.1 Agenti biotici dannosi per le piante</u>	1
<u>1.2 Strategie di difesa delle piante da insetti dannosi</u>	3
<u>1.3 Difese delle piante da funghi fitopatogeni</u>	4
<i>1.3.1 Risposte di difesa mediate dall'acido salicilico</i>	8
<i>1.3.2 Resistenza sistemica indotta</i>	10
<i>1.3.3 Risposte di difesa mediate dall'acido jasmonico</i>	12
<u>1.4 <i>Toxoneuron nigriceps</i> Bracovirus</u>	14
<i>1.4.1 Domini anchirina in pianta</i>	16
<u>1.5 I funghi del genere <i>Trichoderma</i></u>	17
<i>1.5.1 Le idrofobine</i>	19
2 SCOPO DELLA TESI	21
3 MATERIALI E METODI	22
<u>3.1 Descrizione allevamento di piante esprimenti il gene <i>TnBVank1</i> di <i>Toxoneuron nigriceps</i> Bracovirus</u>	22
<u>3.2 Analisi dati Microarray</u>	22
<i>3.2.1 Analisi bioinformatiche</i>	23
<u>3.3 Analisi di espressione genica: elicitazione con <i>Spodoptera littoralis</i></u>	23
<u>3.4 Saggi Biologici con <i>Spodoptera littoralis</i></u>	24
<u>3.5 Trasformazione stabile del gene <i>Htr1</i> in <i>Solanum Lycopersicum</i></u>	25
<i>3.5.1 Plasmide utilizzato</i>	25
<i>3.5.2 Substrati utilizzati per la trasformazione</i>	25
<i>3.5.3 Sterilizzazione e germinazione dei semi</i>	26
<i>3.5.4 Coltura di cellule di <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404</i>	26
<i>3.5.6 Co-coltivazione di espianti e <i>A. tumefaciens</i></i>	27
<i>3.5.7 Coltura degli espianti</i>	27
<i>3.5.8 Radicazione dei germogli e trasferimento in vivo</i>	28

<i>3.5.9 Allevamento e propagazione del materiale transgenico</i>	28
<u>3.6 Caratterizzazione molecolare e fenotipica di piante HTR1</u>	29
<i>3.6.1 Estrazione di DNA e quantificazione</i>	29
<i>3.6.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)</i>	30
<i>3.6.3 Quantificazione con Qubit</i>	30
<i>3.6.4 Southern Blot: preparazione della sonda</i>	31
<i>3.6.5 Digestione del DNA genomico e trasferimento sul filtro</i>	31
<i>3.6.6 Pre-ibridazione e ibridazione della membrana</i>	32
<i>3.6.7 Analisi fenotipica</i>	32
<i>3.6.8 SDS-Page e Western blot</i>	33
<i>3.6.8.1 Estrazione proteine totali da tessuti vegetali</i>	33
<i>3.6.8.2 SDS-PAGE</i>	33
<i>3.6.8.3 Electroblothing e Western Blot</i>	34
<u>3.7 Quantificazione del livello di trascritto in piante esprimenti <i>Htr1</i> e <i>TnBVank1</i></u>	35
<i>3.7.1 Midi-preparazioni plasmidiche</i>	35
<i>3.7.2 Analisi PCR del plasmide estratto</i>	36
<i>3.7.3 Estrazione RNA da foglia</i>	37
<i>3.7.4 Trattamento con DNAsi e sintesi del cDNA</i>	38
<i>3.7.5 RT-PCR</i>	38
<i>3.7.6 Real Time RT-PCR assoluta</i>	39
4 RISULTATI	40
<u>4.1 PARTE I: Le piante di tabacco transgeniche per il gene <i>TnBVank1</i></u>	40
<u>4.1.1 Analisi trascrittomiche di piante ANK</u>	42
<i>4.1.1.1 Geni differenzialmente espressi in tabacco in seguito ad elicitazione con capsiceina (1)</i>	42
<i>4.1.1.2 Geni di tabacco modulati dal gene <i>TnBVank1</i> (2)</i>	49

<i>4.1.1.3 Geni di tabacco modulati dal gene TnBVank1 in seguito ad elicitazione con capsiceina (3)</i>	53
<i>4.1.1.4 Effetto del gene TnBVank1 sul trascrittoma di tabacco in seguito ad elicitazione con capsiceina (4)</i>	59
<u>4.1.2 Effetto delle larve di <i>Spodoptera littoralis</i> sull'espressione del gene <i>PinII</i> nelle piante ANK1 e ANK4</u>	61
<u>4.1.3. Saggio biologico con <i>Spodoptera littoralis</i></u>	63
<u>4.1.4 Caratterizzazione molecolare: quantificazione del livello di trascritto in pianta</u>	64
<i>4.1.4.1 Quantificazione assoluta del gene TnBVank1</i>	64
<u>4.2 PARTE II: Le piante transgeniche di pomodoro per il gene <i>Htr1</i> di <i>Trichoderma hartianum</i></u>	68
<u>4.2.1 Trasformazione di pomodoro</u>	69
<u>4.2.2 Screening molecolare delle piante transgeniche</u>	69
<u>4.2.3 Caratterizzazione molecolare e fenotipica</u>	70
<i>4.2.3.1 Southern Blot</i>	70
<i>4.2.3.2 Analisi fenotipica</i>	74
<i>4.2.3.3 Analisi RT-PCR</i>	76
<i>4.2.3.4 SDS-Page e Western Blot</i>	77
<i>4.2.3.5 Analisi di espressione time-course</i>	78
5 DISCUSSIONI E CONCLUSIONI	80
6 BIBLIOGRAFIA	91
7 APPENDICE	108

1 INTRODUZIONE

I fattori di stress biotico sono la causa della maggior parte della riduzione della resa delle colture agrarie, stimate globalmente superiori al 30% (Oerke *et al.*, 1995). Per fattori di stress biotico si intendono tutti i microrganismi ed animali dannosi per la crescita delle colture quali insetti, funghi patogeni, virus e batteri ed il loro controllo si è sempre basato soprattutto sulla lotta chimica che ricorre all'utilizzo di composti ad ampio spettro e formulati in modo da esercitare un'azione incompatibile con la vita dei fitoparassiti. Tuttavia, l'uso estensivo di pesticidi con ridotta selettività è causa di gravi conseguenze ambientali, favorisce lo sviluppo di resistenze nelle popolazioni di patogeni, causa tossicità nei confronti di organismi non-bersaglio con la conseguente riduzione della biodiversità, incrementando l'inquinamento ambientale e i relativi problemi per la salute pubblica; infatti, la penetrazione di residui di pesticidi nelle falde acquifere, ne determina l'entrata nella catena trofica, arrivando fino all'uomo. Per tale motivo da tempo, la ricerca di metodologie di lotta innovative come la lotta biologica ed il controllo integrato sono considerate di notevole importanza. La lotta biologica è una tecnica che sfrutta i rapporti di antagonismo tra gli organismi viventi, con lo scopo di contenere le popolazioni di quelli dannosi.

Il controllo integrato (*IPM, Integrated Pest Management*), consiste nel raggiungere il controllo non l'eradicazione dei fitoparassiti ma mediante l'integrazione di tecniche capaci di rispettare i principi ecologici, tossicologici ed economici (Tremblay 1999). Il IPM impiega nuove tecnologie a ridotto impatto ambientale abbinando la lotta biologica, l'uso di piante resistenti e prodotti di sintesi le cui quantità possono essere ridotte in funzione del contributo dato al controllo dagli altri fattori. In questo contesto gli studi sulle relazioni antagonistiche insetto-insetto e sulle interazioni benefiche microorganismo-pianta offrono interessanti opportunità per l'identificazione di nuove molecole con potenziale attività pesticida e/o biostimolanti delle difese endogene della pianta.

1.1 Agenti biotici dannosi per le piante

Le piante sono costantemente minacciate da un numero elevato di agenti biotici come virus, batteri ed insetti che hanno sviluppato varie metodologie di attacco, causando danni e sollecitazioni differenti alla pianta.

I batteri ad esempio, penetrano nelle cellule vegetali grazie a ferite, oppure mediante aperture naturali come stomi o idatodi (Melotto *et al.*, 2008) e si replicano all'interno dei vacuoli; i nematodi invece, si nutrono inserendo lo stiletto all'interno delle cellule vegetali; i funghi, possono stabilirsi sulle cellule dell'epidermide ed accrescere le proprie ife sulla superficie, attraverso o tra le cellule del tessuto vegetale (Jones et Dangl, 2006), gli insetti invece, possono lacerare il tessuto fogliare per alimentarsi, oppure nutrirsi di liquidi floematici.

Gli insetti costituiscono la maggior parte degli organismi viventi sulla terra; essi sono tra i più antichi abitanti delle terre emerse ed hanno mostrato un' elevata capacità di adattamento anche agli ambienti più estremi. In base alle loro specializzazioni alimentari possono dividersi in specie umifaghe, micofaghe, entomofaghe, ematofaghe, fitofaghe, saprofaghe, necrofaghe e molte altre. Le specie dannose per le piante possono dividersi in base alla conformazione del loro apparato boccale in fitomizi, muniti di uno stiletto di penetrazione grazie al quale penetrano tra le cellule vegetali e si nutrono del succo floematico (apparato boccale pungente-succhiatore) ed insetti masticatori, muniti di mascelle trituranti (apparato boccale masticatore) con cui provocano un danno simile alla ferita (Tremblay, 1999).

I funghi penetrano nelle cellule vegetali utilizzando diverse strutture della pianta. La loro patogenicità dipende da alcuni fattori di attacco come ad esempio le fitotossine prodotte dal metabolismo secondario specifiche per determinate specie di piante (Uppalati *et al.*, 2007). Essi possono dividersi in biotrofi, biotrofi facoltativi (emi-biotrofi) e necrotrofi. I funghi biotrofi, presentano un *range* di ospiti ristretto, infettano la pianta vivendo nel mesofillo e utilizzano le estremità ifali per l'assorbimento di sostanze nutritive. Un esempio di biotrofo è *P. parastitica* di *Arabidopsis* che infetta le cellule dell'epidermide e sviluppa austeri che sporulano senza causare la morte cellulare dell'ospite (Glazerbrook, 2005). I funghi necrotrofi come *Botrytis cinerea* e *Alternaria brassicicola* uccidono le cellule durante i primi stadi dell'infezione nutrendosi di cellule morte o che sono in procinto di morire, causando un esteso danno al tessuto e producendo una varietà di fitotossine che promuovono la morte cellulare. Tra i funghi emibiotrofi vi è *P. infestans* che infetta piante di patata impiegando una modalità di nutrizione che può essere sia necrotrofa che biotrofica a seconda delle necessità nutrizionali del fungo.

1.2 Strategie di difesa delle piante da insetti dannosi

Per difendersi dall'attacco degli insetti, le piante hanno sviluppato dei meccanismi di difesa, che in base alla fase di attivazione possono essere distinti in costitutivi o inducibili. Le difese costitutive sono rappresentate da barriere fisiche sviluppate dalla pianta durante il suo accrescimento, come pareti lignificate, ispessimenti di callosio, ispessimenti della cuticola, durezza tegumentale, tricomi, spine e molecole allochimiche che fungono da deterrente per gli insetti (Walling, 2009). Tale difesa è attiva principalmente contro gli insetti generalisti, attivi su un'ampia gamma di specie bersaglio (Kessler e Baldwin, 2002). Per tale motivo le piante hanno evoluto sistemi di difesa indotti dall'azione di agenti biotici in modo da spendere energie solo alla percezione di uno stress.

Le difese inducibili in pianta possono dividersi in dirette ed indirette. Per difese dirette si fa riferimento a caratteri o composti prodotti in pianta in grado di diminuire direttamente l'attività dell'insetto durante il suo attacco (Kessler e Baldwin, 2002), come ad esempio la produzione di volatili (VOC) che in alcuni casi fungono da deterrenti impedendo l'ovideposizione di alcuni insetti, la secrezione di resine e lattice.

Le difese dirette inoltre prevedono la sintesi di composti in grado di interferire con il sistema digestivo dell'insetto, causando un mancato assorbimento di sostanze nutritive (Felton e Gatehouse, 1996). Tali difese comprendono varie molecole come inibitori di proteasi, lectine, polifenolo ossidasi e lipossigenasi.

Gli inibitori di proteasi sono enzimi sintetizzati in pianta in seguito a ferita, agiscono impedendo la digestione di proteine e amido di origine vegetale da parte dell'insetto (Ryan, 2000). Le lectine presenti in tessuti di deposito come semi e bulbi, sono glicoproteine che legano mono e oligosaccaridi e per tale motivo risultano essere molto tossiche per gli insetti in quanto influiscono sulla disponibilità e sull'assimilazione dei nutrienti. (Michiels *et al.*, 2010). Le polifenolo ossidasi (PPO) e le lipossigenasi (LOX), in seguito ad attacco, causano l'agglutinazione delle proteine e ossidazione dei composti fenolici riducendo il valore nutritivo del tessuto ingerito da parte dell'insetto.

Le difese indirette si definiscono tali in quanto sono attive nei confronti di insetti fitofagi attraverso l'attrazione di predatori e parassitoidi. In risposta all'attacco di agenti fitofagi, le piante alterano le vie metaboliche che regolano la produzione dei volatili (VOC) sia qualitativamente che quantitativamente. Alcuni VOC risultano essere comuni tra le varie specie di piante, mentre altri sono specie-specifici (Ferry *et al.*, 2004). Geni che regolano la sintesi dei VOC sono attivati in seguito a masticamento od ovideposizione degli erbivori

(Peñaflor *et al.*, 2011). Tali molecole, prodotte da piante attaccate se poste nelle vicinanze di piante sane, attivano la trascrizione di geni di difesa in queste ultime; tale fenomeno prende il nome di “*Priming*”. In letteratura è infatti riportato la capacità di piante di *Nicotiana attenuata* di esprimere inibitori di proteasi se poste nelle vicinanze di piante di *Artemisia tridentata* attaccate da *Manduca sexta* (Kessler *et al.*, 2006). Le vie metaboliche impegnate per la produzione dei VOC sono principalmente i pathway degli octadecanoidi, dello skimmato e degli isoprenoidi, tutti regolati dalla produzione dell’acido jasmonico (JA). Essi sono attivati da elicitori, ovvero molecole prodotte dai patogeni in grado di indurre i sistemi di difesa in pianta. Tra gli elicitori vi sono gli enzimi litici come le β -glucosidasi e acidi grassi coniugati come la volicitina, presente nelle secrezioni orali dell’insetto e che causa l’induzione dell’espressione di geni impiegati nella sintesi di volatili in mais (Ferry *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2000; Kessler et Baldwin, 2002)

1.3 Difese delle piante da funghi fitopatogeni

L’attacco di funghi patogeni è causa di risposte di difese, anch’esse divise in costitutive (barriere esterne e molecole deterrenti) e dinamiche, divise a loro volta in meccaniche e biochimiche. Le barriere fisiche, già descritte nel paragrafo precedente per gli insetti, sono importanti fattori in grado di impedire o rallentare la penetrazione del fungo. La resistenza biochimica contro i funghi include molecole più specificamente indirizzate contro tali agenti quali glucosidi e composti fenolici, che possono essere presenti anche precedentemente all’infezione, mentre solo in seguito all’infezione vi è la produzione di alcaloidi, saponine, tannini, sostanze fenoliche, fitoalessine, proteine PR, etc.

Nell’interazione pianta-patogeno, se le difese costitutive riescono a contrastare il processo infettivo, la pianta viene definita “non ospite”; al contrario viene definita “ospite” se c’è il riconoscimento di fattori specifici del patogeno che consentono l’innescarsi delle risposte difensive. In questo ultimo caso le piante possono rivelarsi tolleranti, suscettibili o resistenti all’invasore. Sono definite tolleranti le piante in grado di arginare il danno provocato dall’infezione, minimizzando le perdite; suscettibili, quelle in cui viene ad instaurarsi la patologia; resistenti quelle che, in seguito al riconoscimento del patogeno, sono in grado di attivare risposte di difesa.

La teoria “gene per gene” di Flor (1955) afferma che la pianta percepisce il patogeno quando si instaura un’interazione pianta-patogeno incompatibile, ossia quando la pianta possiede un gene di resistenza (*gene R*) che codifica per un recettore specifico per un

fattore di avirulenza (*Avr*) del fungo. Se entrambi i geni (gene R ed *Avr*) sono dominanti ed omologhi, vi è il riconoscimento da parte della pianta del patogeno, sviluppando così una reazione incompatibile ed innescando le risposte di difesa. Se uno dei due geni è recessivo avviene una reazione compatibile e si avrà lo sviluppo della patologia con l'attivazione dei vari *pathway* metabolici con lo scopo di contrastare l'infezione (Jones e Dangl, 2006).

Tale sistema di interazione appartiene al “*plant immunity system*” e spiega la co-evoluzione nei due organismi mediante il continuo succedersi dei caratteri di resistenza e avirulenza nelle due popolazioni. Uno schema di tale interazione è rappresentato dallo *Zig-Zag model* mostrato in figura 1. In una prima fase, i recettori vegetali chiamati *Pattern Recognition Receptor* (PRR) riconoscono i pattern molecolari associati a patogeni definiti *Pathogen- o Microbial- Associated Molecular Pattern* (PAMPS o MAMPS), attivando le prime risposte di difesa che bloccano o rallentano la colonizzazione del patogeno. Tale risposta è definita *Pamp Triggered Immunity* (PTI). In seguito, i patogeni secernono effettori che sopprimono la PTI, rendendo la pianta nuovamente suscettibile, definiti *Effector Triggered Susceptibility* (ETS). Tali fattori, una volta riconosciuti da un gene R, attivano le risposte *Effector Triggered immunity* (ETI) provocando una resistenza al danno. In molti casi ETI e PTI attivano le stesse risposte, anche se ETI risulta essere una reazione più rapida e amplificata dell'interazione pianta-patogeno, capace di conferire resistenza al danno mediante l'instaurarsi di una risposta ipersensibile (HR) (Bari *et al.*, 2009; Chisholm *et al.*, 2006). Nell'ultima fase i patogeni superano il riconoscimento dei geni R attraverso la produzione di altri fattori di virulenza che sopprimono ETI (Jones e Dangl 2006).

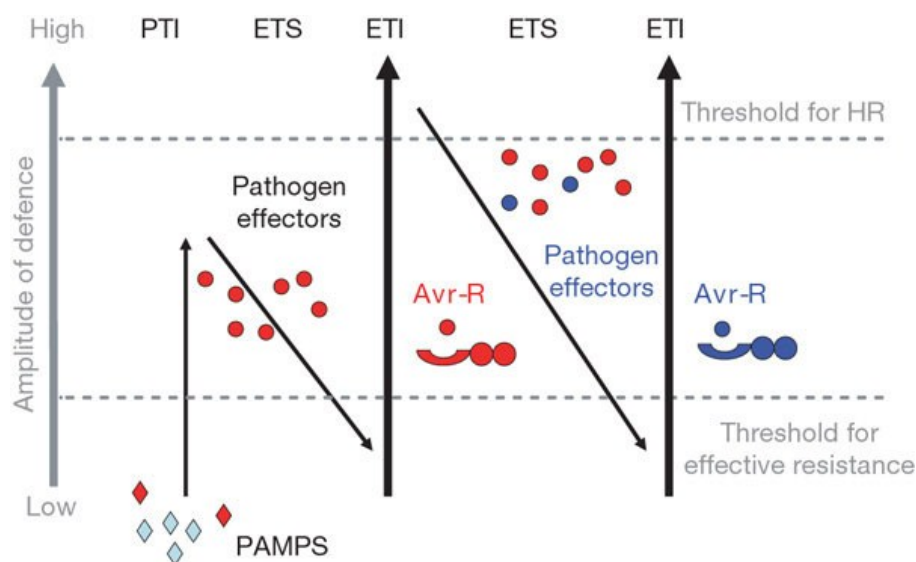


Fig1: Rappresentazione Zig-Zag model(Jones e Dangl 2006)

I PAMPS, definiti come elicitatori generali esogeni prodotti dai patogeni durante i primi stadi dell'infezione, possono essere lipidi, polipeptidi, frammenti di DNA batterici e proteine del capsido ed interagiscono con i recettori di membrana aventi un dominio *Leucine Rich Repeats* (LRR). Essi hanno un ristretto *range* di ospiti; ad esempio, la proteina batterica *cold shock* è specifica per i recettori delle *Solanaceae*, mentre *l'elongation factor-Tu* (EF-Tu) per le *Brassicaceae* (Zipfel *et al.*, 2006; Felix e Boller, 2003).

La flagellina batterica è un induttore della PTI in varie specie vegetali, infatti, è riportato in letteratura che un peptide di sintesi costituito da 22 amminoacidi (flg22) proveniente da un dominio conservato della flagellina è sufficiente per indurre risposte di difesa in meno di un' ora in *Arabidopsis* (Zipfel *et al.*, 2004). Il peptide è riconosciuto in pianta dal recettore FLS2 (Chinchilla *et al.*, 2006) che presenta omologie con i recettori di membrana presenti in animali ed insetti. Il legame tra queste due molecole attiva in pianta risposte di difesa in seguito ad attacco di *Pseudomonas syringae*, causando l'inibizione del patogeno (Zipfel *et al.*, 2004), mentre mutanti *fls2* risultano essere suscettibili a tale patogeno.

La proteina *Brassinosteroid Insensitive 1-associated kinase1* (BAK1) ha un ruolo chiave nella PTI. Essa, infatti, ha il compito di agire come co-recettore dei recettori di membrana in seguito ad elicitazione con PAMPS ed è stato dimostrato che in seguito al riconoscimento sia LRRs (*Leucine Rich Repeats*) che BAK sono fosforilati ed attivano successivamente le varie risposte di difesa (Schulze *et al.*, 2010).

Alcuni effettori hanno il compito di sopprimere la risposta PTI come alcuni batteri patogeni che durante la patogenesi rilasciano circa 15-30 effettori alla volta nelle cellule ospite mediante il sistema di secrezione di tipo III (TTSS) (Cunnac *et al.*, 2009) mediante il quale passano direttamente dalla cellula batterica alla cellula ospite. Gli effettori batterici contribuiscono alla virulenza del patogeno inibendo le funzioni cellulari eucariotiche, come l'effettore HopM di *P.syringae* che lega un ARF-GEF proteina impiegata nel trasporto delle vescicole nella cellula ospite (Desveaux *et al.*, 2006). E' riportato inoltre, in letteratura la capacità di alcuni effettori di sopprimere le risposte immunitarie come nel caso di Avr3a di *Phytophthora infestans* che interagisce con una *U-box E3 ligase* (CmPG1). La stessa attività è stata identificata in *AvrPtoB* isolato da *P.syringae*, ma l'effettore ha una duplice azione: la sequenza N-terminale contribuisce alla virulenza, mentre quella C-terminale ha la funzione di bloccare la morte cellulare (Abramovitch *et al.*, 2003; De Torres *et al.*, 2006). Tali effettori non appartengono solo a virus e batteri, ma sono stati identificati anche nella saliva di un nematode fitopatogeno (*Meloidgyne incognita*) e sembrano essere in grado di modulare l'espressione genica dell'ospite (Bellafiore *et al.*, 2008).

Gli effettori sono riconosciuti in pianta da recettori di membrana codificati da geni R e presentano domini altamente conservati: domini *Nucleotide Binding Domain* (NBS) che legano molecole ad alto contenuto energetico come ATP e GTP; domini *Leucine Rich Repeats* (LRR) con ripetizione di leucine molto frequenti nei recettori proteici in pianta; domini a cerniera *leucin zipper* (LZ) importanti per le interazioni con gli acidi nucleici; domini TIR, responsabile della trasduzione del segnale che mostrano omologia con il recettore Toll di *Drosophila melanogaster* impegnato nell'attivazione della risposta immunitaria in seguito ad attacco di funghi e batteri Gram-positivi (Hulbert *et al.*, 2001).

Il riconoscimento da parte della pianta di elicitori di patogenicità rappresentati da componenti della parete fungina (chitina, chitosani e glucani), metaboliti proteici o polisaccaridi attivano la produzione di specie reattive dell'ossigeno e acido nitrico (NO) che avviano la reazione di ipersensibilità HR (Walling, 2009).

L'attivazione del *burst ossidativo* con la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è uno dei primi segnali di difesa. L'incremento della concentrazione degli ioni Ca^{+} nel citoplasma è causa della fosforilazione della NADPH ossidasi di membrana che produce uno ione superossido O_2^{-} (Kobayashi *et al.*, 2007). Lo ione superossido viene rilasciato nell'apoplasto e grazie alla superossido dismutasi (SOD) che lo utilizza per la formazione di perossido di idrogeno (H_2O_2) che a sua volta viene ridotto da altri enzimi come l'ascorbato perossidasi ad acqua ed ossigeno (Møller *et al.*, 2007). La centralità del ruolo di NADPH nel burst ossidativo è dimostrata da un esperimento *knock-out* del gene in tabacco e in *Arabidopsis* con conseguente inattivazione del "burst ossidativo" dopo il trattamento con un elicitore fungino e successivo attacco di *Peronospora parasitica* (Nürnberg *et al.*, 2004). I ROS non solo esplicano una funzione tossica nei confronti del patogeno nello spazio intercellulare, ma sono anche una componente del "*signalling*" fondamentale all'avvio della cascata di segnali che consentono la trascrizione di specifici geni e l'attivazione dei vari pathway di difesa. Inoltre, H_2O_2 media i legami crociati tra le glicoproteine di parete causandone l'aggregazione ed il conseguente inspessimento della parete incrementando le barriere fisiche protettive (Kovtun *et al.*, 2000). L'attivazione della risposta HR consente l'attivazione di geni di difesa prima a livello locale inducendo la Resistenza Locale Acquisita (LAR) e poi a livello sistemico la Resistenza Sistemica Acquisita (SAR).

1.3.1 Risposte di difesa mediate dall'acido salicilico

La Resistenza Sistemica Acquisita è un meccanismo di difesa indotta che conferisce una duratura protezione in pianta contro un ampio spettro di micorganismi (Durrant and Dong, 2004). Essa è indotta dall'acido salicilico (SA) e da i suoi derivati quale il metil-salicilato (MeSA) e prevede l'attivazione della trascrizione di numerose molecole impegnate nella difesa biochimica post-infezionale come fitoalessine che prodotte a livello basale in pianta, sono collocate in diversi subcompartimenti cellulari come il vacuolo e rilasciate solo in seguito a ferite e proteine legate alla patogenesi (PR-protein). Le proteine collegate alla patogenesi o PR-proteins, divise in 17 classi in base ad omologie strutturali, (Christensen *et al.*, 2003) possono avere una collocazione extracellulare (apoplasto) o intracellulare (vacuolo). Le proteine PR1, la cui specifica funzione è ancora sconosciuta (Rivière *et al.*, 2008), svolgono un ruolo centrale nell'induzione delle risposte di difesa contro fitopatogeni e nella modulazione della resistenza sistemica acquisita (SAR). In tabacco sono state identificate varie isoforme, denominate PR-1a, PR-1b e per un ulteriore approfondimento sulla loro funzione sono stati prodotti mutanti *pr-1* che risultano essere più suscettibili all'infezione provocata da *Phytophthora parasitica* (Glazebrook, 2005). Queste proteine difensive sono prodotte in seguito al riconoscimento di elicitatori fungini e insieme ad altre proteine quali le β 1-3glucanasi (PR2), chitinasi (PR-3, PR-8 e Pr-11) e metaboliti secondari come le fitoalessine, contribuiscono in maniera concertata alla resistenza al patogeno. Alla classe delle PR-2 appartengono le β -1,3glucanasi, enzimi idrolitici che hanno il compito di degradare e idrolizzare i β -1-3 e β -1-6 dei glucani, indotte in seguito ad attacco di fitofagi o in seguito a danno meccanico, minimizzando l'infestazione nel punto della ferita. In letteratura è ampiamente riportato l'effetto sinergico delle glucanasi e chitinasi (Melchers et Stuiver, 2000). Queste ultime (PR-3, PR-8 e Pr-11) sono enzimi idrolitici in grado di degradare la chitina, una delle principali componenti della parete di funghi, batteri e l'esoscheletro degli insetti.

L'acido salicilico (SA) ricopre un ruolo chiave nell'attivazione della resistenza sistemica acquisita attivando le difese anche nelle parti della pianta non interessate dall'attacco. Questa molecola è un derivato dell'acido p-cumarico, ed il segnale a monte è regolato in seguito all'interazione del patogeno con il recettore di membrana TIR-NBS-LRR (Fig.2) e l'interazione delle proteine *Enhanced Disease Susceptibility1* (EDS1) e *Phytoalexin deficient4* (PAD4), esse stesse regolate dal SA mediante un *feedback* positivo. Questo feedback positivo potenzia l'azione del SA e potrebbe essere regolato da omodimeri di EDS1 presenti nel citosol, complessi nucleo-citoplasmatici di EDS1-PAD4 e da interazioni

nel nucleo di EDS1-PAD4 con *Senescence-Associated Gene 101* (SAG101) necessarie per l'attivazione di geni di resistenza. Un altro gene che agisce a monte del SA codifica per la proteina *Non specific disease resistance* (NDR1). Questa proteina si trova ancorata alla membrana ed interagisce con un recettore avente dominio CC-NBS-LRR; l'interazione tra NDR1 con la proteina *RPM1-interacting protein4* (RPM4), regola l'attivazione di geni R. Anche il Ca^{2+} e calmodulina (CaM) sono impegnati nella regolazione ed accumulo di SA. Infatti, il legame Ca^{2+} /CaM al fattore *Signal Responsive1* (SR1) (fattore trascrizionale che lega il complesso Ca^{2+} /CaM) reprime l'espressione di EDS1 e sopprime l'accumulo di SA e delle risposte di difesa da esso mediata, mentre il legame di CaM a *CaMPTI-induced CaM binding protein60-like* ne causa l'accumulo e la resistenza al patogeno (Vlot *et al.*, 2009). Un derivato dell'acido salicilico è il MeSA, molecola impiegata nella traslocazione del segnale e sintetizzata dall'enzima SAMT1 (*SA-metil transferase*), per poi essere in seguito traslocato nelle foglie distali e idrolizzato dalla *MeSA methyl esterase* (SAPB2) ad acido salicilico, attivando così i geni di difesa (Park *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009).

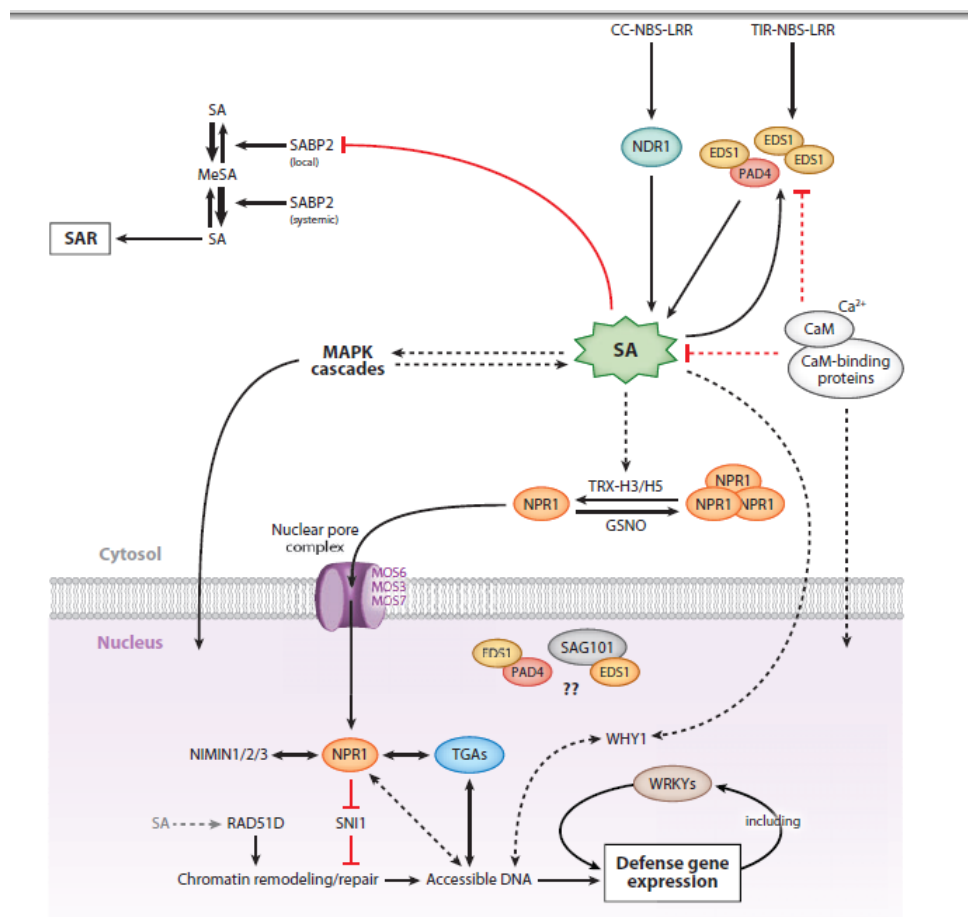


Fig.2: Rappresentazione schematica del segnale del SA durante la resistenza a danno (Vlot *et al.*, 2009).

I segnali di attivazione della SAR a valle della produzione dell'acido salicilico sono regolati da una serie di geni quali NPR1, conosciuto anche come NIM1, regolatore e attivatore centrale della SAR contenente un dominio anchirina e dominio *broadcomplex*, *tramtrack*, *bric-a-brac/poxvirus*, *zinc-finger* (BTB/POZ) (Delaney, 2000). Il ruolo chiave di questa proteina è stata identificata mediante la produzione di mutanti “*los-of-function*”, che sono risultati incapaci di esprimere proteine PR e risultando suscettibili a *Peronospora parasitica* (Delaney, 2000). L'incremento dei livelli di SA e il conseguente cambiamento nello stato ossidativo cellulare, comporta una riduzione di ponti disolfuro a carico di NPR1 che passa da forma oligomerica a monomerica migrando dal citoplasma al nucleo, dove interagisce con i fattori di trascrizione bzip, della famiglia dei TGA, per la trascrizione delle PR-1 e la soppressione del *signalling* dell'acido jasmonico (Pieters e Van Loon, 2004). L'importanza di NPR1 nell'induzione della SAR e quindi nelle risposte di difesa è stata stabilita mediante la produzione di mutanti *npr1* che overesprimevano la proteina in forma monomerica, mostrando una maggiore resistenza a *P.paranastica* e *P.syringae* (Tada *et al.*, 2008; Vlot *et al.*, 2009).

1.3.2 Resistenza sistemica indotta

L'apparato radicale delle piante subisce colonizzazioni da parte dei microrganismi presenti nel suolo come batteri e funghi con cui possono essere instaurate interazioni benefiche o deleteree. Un classico esempio di interazioni benefiche è rappresentato dalle micorrize e da batteri azotofissatori che stabiliscono una vera e propria simbiosi con la pianta da cui ottengono un costante flusso di substrati carboniosi, in cambio di una più semplice assimilazione dei nutrienti, di acqua e minerali nel caso delle micorrize, mentre i batteri azoto fissatori metabolizzano l'azoto atmosferico fissandolo in composti organici. In altre interazioni positive i microrganismi stimolano lo sviluppo della pianta allertandole contro gli attacchi di agenti patogeni. I determinanti microbici di tali effetti genici, sono stati studiati principalmente in ceppi non patogenici di *Pseudomonas spp* (Van Wees *et al.*, 2008). La stimolazione della difesa in pianta causata da funghi patogeni avviene mediante elicitori (MAMPS), costituiti principalmente da lipopolisaccaridi e flagellina. Tali elicitori sono stati identificati anche in organismi simbiotici benefici come *Pseudomonas fluorescent*, funghi appartenenti al genere *Trichoderma* e *Bacillus subtilis*. Tra i MAMPS definiti positivi vi sono varie tipologie di molecole come lipopolisaccaridi, flagellina, antibiotici e proteine. La produzione di ceppi mutati di *Pseudomonas fluorescens* aventi

delezioni per i geni codificanti flagellina ed LPS non mostrano la stessa attività dei *wild type*, rivelando l'importanza di tali nell'interazioni con la pianta. L'antibiotico 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) prodotto da vari ceppi di *Pseudomonas* attiva risposte sistemiche in *Arabidopsis*. Anche i volatili come il 2,3-Butandiolo sono annoverati tra questa classe. Prodotto da due ceppi di *Bacillus*, questo composto incrementa la resistenza a patogeni in *Arabidopsis*. Le specie appartenenti al genere *Trichoderma* invece, producono MAMPS come la proteina Sm1 la cui overespressione o delezione causa variazioni nella risposta a patogeni (Van Wees *et al.*, 2008). La resistenza in pianta prodotta da questi microrganismi prende il nome di Resistenza Sistemica Indotta (ISR) ed ha il compito di allertare le piante per renderle resistenti all'attacco dei patogeni. Risulta molto probabile che sia MAMPS patogenici che quelli benefici siano riconosciuti dagli stessi recettori dato che entrambi attivano dei sistemi che coinvolgono ormoni come SA, JA ed ET (Glazebrook, 2005). Analisi trascrittomiche effettuate in seguito a colonizzazione di radici di *Arabidopsis* con ceppi non patogeni di *Pseudomonas* WCS417 hanno rivelato la modulazione in pianta di 94 geni tra cui il fattore di trascrizione *R2R3-MYB-like transcription factor gene* (MYB72) (Verhagen *et al.*, 2004). La produzione di mutanti *knockout* di *Arabidopsis* per tale gene, ha rivelato l'incapacità delle piante di attivare la risposta ISR in seguito al trattamento con il patogeno *Pseudomonas syringae* pv tomato, *Hyaloperonospora parasitica*, *Alternaria brassicicola*, and *Botrytis cinerea*, evidenziando la sua importanza nell'attivazione della risposta (Wang *et al.*, 2005; Van der Ent *et al.*, 2008). L'overespressione di MYB72 in pianta non ha evidenziato un'aumento della ISR in seguito a trattamento con patogeni, facendo così ipotizzare che per l'attivazione della risposta sistemica, è richiesta una sua interazione con un fattore di trascrizione, che è stato poi successivamente identificato nel fattore *ETHYLENE INSENSITIVE3 (EIN3)-LIKE3* (EIL3) (Van der Ent *et al.*, 2008). A seguito del legame EIL3/MYB72 è stato identificato il coinvolgimento dell' ET nel trasferimento del segnale alla parte aerea, dove è richiesto NPR1. L'espressione sistemica della ISR è associata all'attivazione di una serie di geni che regolano la produzione di JA ed ET, indicando il coinvolgimento concertato di vari ormoni nella regolazione di questo tipo di risposta (Fig.3).

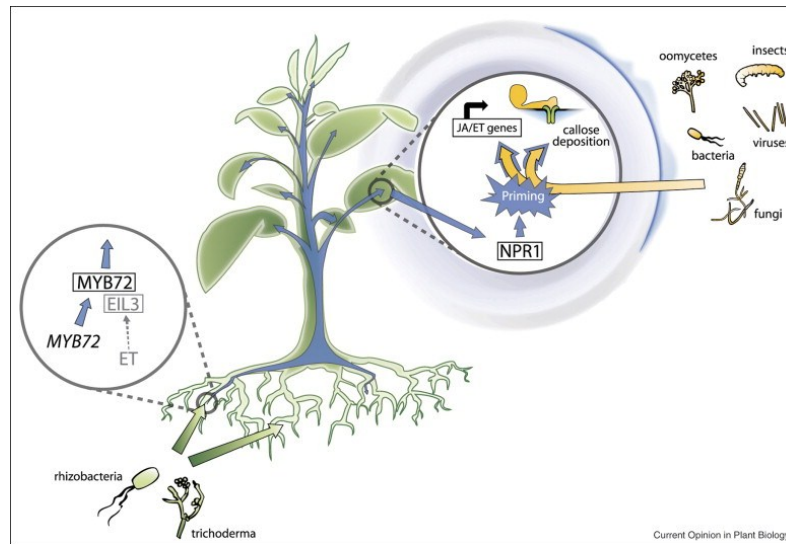


Fig.3: Modello ISR pathway in *Arabidopsis thaliana* (Van Wees *et al.*, 2008)

1.3.3 Risposte di difesa mediate dall'acido jasmonico

I *pathway* dell'acido jasmonico ed etilene sono di solito associati alle risposte di difesa nei confronti di funghi necrotrofi e di insetti masticatori, come ad esempio *Manduca sexta*, *Pieris rapae* o *Frankliniella occidentalis* (Reymond *et al.*, 2004; De vos *et al.*, 2005). Mutanti difettivi nella biosintesi del JA mostrano una mancata resistenza all'attacco degli insetti (Paschold *et al.*, 2007, Zarate *et al.*, 2007), indicando la sua centralità nella regolazione delle risposte di difesa. Tra gli elicitori del *pathway* degli octadecanoidi, in cui acido jasmonico (JA) e derivati vengono prodotti, vi sono le secrezioni orali dei fitofagi (Schittko *et al.*, 2001) e il regurgitato degli stessi. Tra le molecole implicate nell'attivazione del signalling del JA nelle *Solanacee* vi è la sistemina (McGurl *et al.*, 1994), un ormone vegetale composto da 18 amminoacidi, rilasciato in seguito a taglio di un precursore di 200 amminoacidi. In seguito a ferita, la sistemina viene rilasciata e interagisce con un recettore di membrana che attiva una cascata di segnali quali l'aumento del Ca^{2+} intracellulare, attivazione delle MAPK e fosfolipasi, attivando così la via degli octadecanoidi con la produzione di JA. Mediante la *Jasmonate resistant 1* (JAR1), che codifica per una sintasi, vi è la coniugazione della isoleucina al JA e la formazione di JA-Ile che risulta essere la forma attiva di questo ormone (Staswick and Tiryaki, 2004). La proteina *Coronatine insensitive 1* (COI1) è una f-box protein che ha il ruolo di recettore del JA-Ile nel E3 ubiquitin-ligase Skip-cullin-F-box complex SCF^{COI1} (Yan *et al.*, 2009; Sheard *et al.*, 2010). Il legame di JA-Ile con COI1 porta alla degradazione via proteosoma del *jasmonate ZIM-domain* (JAZ), un repressore trascrizionale (Chini *et al.*, 2007; Thines *et*

al., 2007). Al segnale di difesa mediato dall'acido jasmonico, cooperano altri ormoni come l'etilene (ET) e l'acido abscissico (ABA) (Adie *et al.*, 2007; Kazan and Manners, 2008). ET e ABA sono prodotti in seguito ad infezione mediata da patogeni necrotrofi; tali ormoni agiscono in maniera sinergica sull'espressione dei geni implicati nella difesa come *plant defensin1.2* (PDF1.2; Penninckx *et al.*, 1998). Tra i principali amplificatori del segnale JA ed ET, ci sono i fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia delle *APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR* (AP2/ERF) ERF1 e ORA59. E' stato dimostrato che piante esprimenti RNAi-ORA59 risultano incapaci di attivare il segnale ET/JA, dimostrando la sua importanza dell'attivazione del segnale (Verhage *et al.*, 2011). Un altro fattore importante è il *Jasmonate insensitive1/MYC2* (JIN1/MYC2), esso agisce in maniera sinergica con ABA, bloccando la regolazione dei fattori trascrizionali ERF (Anderson *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2004) ed attiva la trascrizione di altri geni implicati nel pathway del JA.

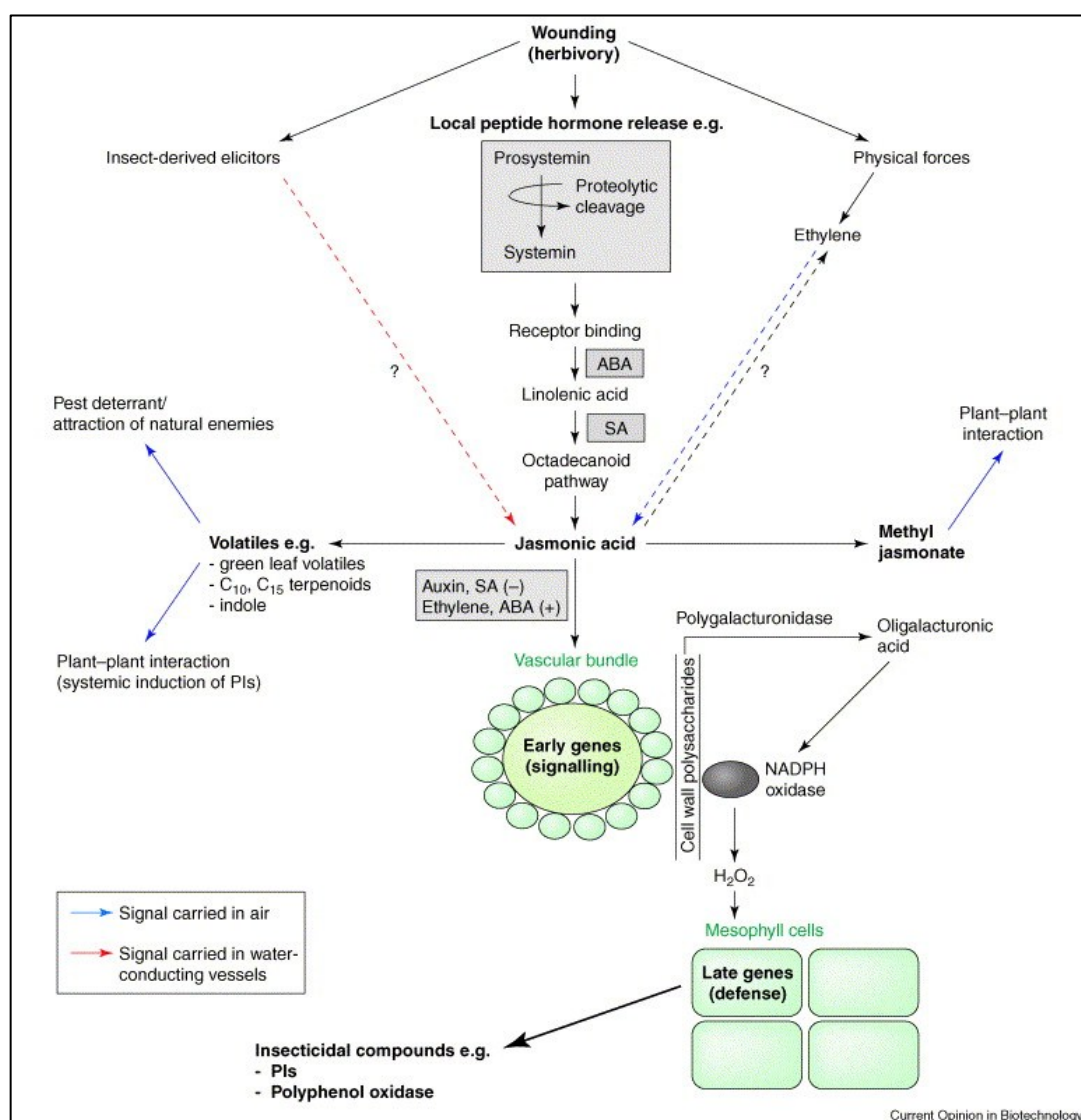


Fig.4: attivazione del pathway JA in seguito a wounding (Ferry *et al.*, 2004)

1.4 *Toxoneuron nigriceps* *Bracovirus*

Toxoneuron nigriceps, parassitoide endofago di larve di *Heliothis virescens*, appartiene alla famiglia degli *Hymenoptera Braconide* ed è un simbionte del *Toxoneuron nigriceps* *Bracovirus* un poli DNA-virus (Malva *et al.*, 2004). I parassitoidi endofagi hanno la capacità di parassitizzare l'ospite non producendo subito effetti evidenti sulla sua fisiologia, in quanto lasciano attivo il loro ospite nello svolgimento delle sue funzioni vitali in una fase iniziale, per poi passare alla fase parassita in un secondo momento. Nella fase attiva della parassitizzazione l'ospite subisce modificazioni del sistema immunitario, endocrino e riproduttivo. La successiva alterazione della fisiologia nutrizionale, potrebbe essere un effetto causato dalla modificazione del sistema endocrino come l'elevata produzione dello *juvenile hormone* (JH) che, non permettendo l'avanzamento dello stadio larvale, veicola tutte le fonti di nutrimento verso il parassita. Alcuni di essi, come le *Aphidiine braconide*, causano la completa degenerazione dell'apparato riproduttore. L'azione del parassitoide è favorita dalla sua interazione con virus presenti nel calice ovarico della femmina chiamati PoliDNA virus (PDV). I PDV sono simbionti obbligati di imenotteri endoparassitoidi e si dividono in due gruppi: *Ichnovirus* e *Bracovirus* (Pennacchio e Strand 2006). L'integrazione nel genoma dell'endoparassitoide non è casuale; essi sono inoltre in grado di replicarsi solo nel calice ovarico della femmina e solo nel tardo sviluppo della pupa. Durante la parassitizzazione, questi vengono iniettati nell'ospite con le uova, dove non sono più in grado di replicarsi, ma solo di dare inizio alla trascrizione di geni implicati nella parassitizzazione. Essi sono trascrizionalmente attivi nei tessuti malpighiani, fat body, gut, ed emociti. I geni espressi dal virus possono essere divisi in tre classi: geni di classe I, espressi solo nel parassitoide guidano la replicazione e l'impaccamento delle cellule virali; classe II espressi nell'ospite durante la parassitizzazione (Pennacchio *et al.*, 1993); classe III espressi sia nel parassita che nel parassitoide.

L'endoparassitoide *Toxoneuron nigriceps* parassitizza larve di quinta età provocando variazioni a livello fisiologico e morfologico nell'ospite: perdita della capacità di impuparsi, alterazione della composizione emolinfatica che risulta essere di alto valore nutritivo per il parassitoide, alterazione del sistema immunitario e dell'equilibrio endocrino, inattivazione delle ghiandole protoraciche che causa l'abbassamento della secrezione dell'ormone della muta, attività trascrizionale alterata ed abbassamento generale della sintesi proteica (Pennacchio e Strand 2006).

Al momento della parassitizzazione *Toxoneuron nigriceps* inietta all'interno dell'ospite uova con le secrezioni del tratto genitale contenenti veleno e particelle dei poli DNAB virus appartenenti alla specie dei *Bracovirus*. Il suo genoma è composto da elementi circolari di dsDNA che varia da 2,5 a 32 kb (Varricchio *et al.*, 1999).

Il virus è incapace di replicarsi nell'ospite, ma in seguito alla parassitizzazione attiva la trascrizione di alcuni geni quali *TnBVI* (attivo tra 12-48h) che codifica per proteine impegnate nel coinvolgimento della risposta immunitaria (Varricchio *et al.*, 1999); *TnBV2* (attivo tra 24-48h), la cui attività proteasica potrebbe essere legata alla distruzione del citoscheletro (Falabella *et al.*, 2003) e la tirosin fosfatasi PTPs i cui prodotti proteici sono coinvolti in risposta a sollecitazioni intra o extracellulari (Kennelly e Krebs, 1991).

I geni sequenziati *TnBvank* (1-3) che presentano omologia con le κB di mammiferi, sono chiamati *I κ B-like* costituiti da domini anchirina, presenti in proteine con differenti attività come fattori trascrizionali, regolatori di sviluppo e tossine. Il dominio anchirina è composto da 33 aminoacidi di cui 15 altamente conservati (Palek and Lambert, 1990), formanti due eliche antiparallele connesse ad un motivo β -hairpin, mediano l'interazione proteina-proteina in diverse famiglie e sono in grado di legare il fattore NF- κB . L'analisi della struttura primaria della proteina ha rivelato l'assenza all'estremità N-terminale di un *Signal receiving domain* (SRD) impiegato per la fosforilazione su serina necessaria alla successiva ubiquitinazione e del dominio PEST coinvolto nel rapido turnover (Ghosh *et al.*, 1998; Ghosh e Karin, 2002). Per queste sue caratteristiche è possibile ipotizzare un legame irreversibile dei prodotti *TnBvank1* con l'NF- κB dell'ospite, che sopprime la risposta immunitaria, in particolare inibendo i geni che codificano per peptidi antimicrobici (Thoetkiattikul *et al.*, 2005)

Le κB sono regolatori della risposta immunitaria di insetti e mammiferi. Presenti nel citoplasma in forma inattiva, una volta legate alle NF- κB ne mascherano il segnale di localizzazione nucleare (NLS). A seguito di uno stimolo esterno, vi è l'attivazione delle κB chinasi (Karin and Ben-Neriah, 2000) che fosforilano la serina all'estremità N-terminale delle κB che sono poi degradate dal proteosoma. La degradazione scopre il segnale NLS che permette il trasferimento di NF- κB nel nucleo dove mediante il legame con gli *enhancer* attiva i geni *target* e riattiva la sintesi di κB che rientra nel nucleo e legandosi a NF- κB lo trasporta nel citoplasma (Sun *et al.*, 1993). Il meccanismo di interazione NF- κB e κB è stato studiato in *Drosophila melanogaster* dove le *I κ B-like* presentano il 30% di identità con il gene *cactus*. In questo sistema sono presenti due vie di risposta ai patogeni,

la prima chiamata via dell' "IMD" attiva contro batteri Gram negativi, la seconda chiamata via "Toll" attiva contro i Gram positivi e funghi. Nel citoplasma è presente la proteina CACTUS legata a due proteine DIF e Dorsal, l'attivazione del *pathway* in seguito ad infezione è mediata dal recettore e una proteina *Spaetzle* che attivano la fosforilazione e in seguito la degradazione di CACTUS, causando la traslocazione delle $\text{I}\kappa\text{B}$ nel nucleo e la trascrizione dei geni target che codificano per Drosomicina e la Metchnikowina (Hoffmann e Reichhart, 2002; Hoffmann, 2003).

Si ipotizza così che le proteine *IkB-like* codificate dai geni *TnBvank1* competano con i fattori $\text{I}\kappa\text{B}$ endogeni dell'insetto parassitizzato ed interagiscano con la proteina $\text{Nf-}\kappa\text{B}$, impedendone la sua traslocazione nel nucleo con la conseguente mancata attivazione della via di trasduzione del segnale, necessario per l'attivazione della risposta immunitaria. e la loro degradazione è impedita dall'assenza dei domini PEST ed SRD.

1.4.1 Domini anchirina in pianta

Sono state identificate in pianta diverse proteine aventi domini anchirina con funzione $\text{I}\kappa\text{B}$ -like. Allineamenti di sequenza tra queste proteine e *TnBvank1* ha rivelato basse percentuali di identità. La funzione $\text{I}\kappa\text{B}$ meglio caratterizzata in pianta appartiene alla proteina NPR1, descritta precedentemente. In *Arabidopsis* è stata identificata la proteina AKR2, attiva nella regolazione del livello del perossido di idrogeno. AKR2 ottimizza l'attività di un ascorbato perossidasi APX3 che preleva e trasporta sulle membrane dei perossisomi velocizzando così l'attività di degradazione della molecola (Shen *et al.*, 2010). La sua sottoespressione è causa dell'incremento dei ROS e della trascrizione di PR-protein. Anche in tabacco sono state identificate proteine con domini anchirina chiamate NtANK1. Questa proteina, omologa di AKR2 presenta un'identità di sequenza pari al 66%. Essa è un regolatore chiave nel pathway delle auxine, infatti, è riportato in letteratura che in seguito al trattamento con auxina, la proteina trasloca nel nucleo dove si lega al fattore BZI-1 (Kuhlmann M. *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2002). Il fattore BZI-1 è un attivatore trascrizionale dei geni impiegati nelle risposte di difesa, è attivo nei confronti di geni responsabili della morte cellulare e della risposta ipersensibile, mentre NtANK1 risulta essere un regolatore negativo di tale fattore in quanto nella risposta a patogeni risulta essere sottoespresso (Kuhlmann *et al.*, 2003). Anche il coattivatore delle risposte di difesa bZIP10 coinvolte nella HR ha lo stesso meccanismo di interazione $\text{NF-}\kappa\text{B}$ - $\text{I}\kappa\text{B}$ in quanto il fattore è presente nel citoplasma legato alla proteina *Zinc-Finger protein Lesion Stimulating Disease*

resistance 1 (LSD1), l'attivazione del burst ossidativo, causa la dissociazione di LSD1 e la traslocazione nel nucleo di bZIP10 che attiva i geni di difesa (Kaminaka *et al.*, 2006). In *Arabidopsis* è stata identificata la proteina di membrana ACD6 che agisce nella morte cellulare programmata, la proteina interagisce con i fattori EDS1 e PAD4, mutazioni puntiformi hanno incrementato la trascrizione dei due fattori e di PR1 (Dong 2004). Altre proteine aventi domini anchirina sono state identificate nel regno vegetale aventi ruoli rilevanti nelle risposte di difesa: ZFAR1 in pomodoro codifica per una zinc-finger protein, mutanti mostrano un incremento della suscettibilità a Botrytis; ITN1 impiegata nella trasduzione del segnale e XB3 che in riso interagisce un dominio chinasi XA21 incrementando la resistenza a *Xantomonas orzae* pv *orzae* (Huang *et al.*, 2009). Per le sue capacità di interagire con altri componenti cellulari ed essere impegnare in risposte di difesa il gene *TnBvank1* può essere considerato nell'industria biotecnologica come molecola target attiva contro patogeni (Pennacchio e Strand, 2006).

1.5 I funghi del genere *Trichoderma*

I funghi appartenenti al genere *Trichoderma* sono inclusi nel gruppo dei deuteromiceti. Essi hanno la capacità di vivere in simbiosi con la pianta stimolandone la crescita di fusto e radici e attivando una risposta sistemica che la rende meno suscettibile all'attacco dei patogeni. Essi riescono a produrre un'elevata quantità di enzimi extracellulari come chitinasi e glucanasi e di produrre metaboliti con attività antibiotica che li rende capaci di competere nella propria nicchia trofica (Vinale *et al.*, 2008; Rubio *et al.*, 2009). Per questi motivi i funghi del genere *Trichoderma* sono di grande interesse ecologico ma soprattutto commerciale, basti pensare che la maggior parte dei formulati agricoli sono a base di *Trichoderma* (Harman *et al.*, 2004, Woo and Lorito 2007).

La sua azione da antagonista nei confronti di molti fitopatogeni si svolge mediante meccanismi di antibiosi, micoparassitismo e competizione di nutrienti. Nell'interazione di *Trichoderma*-funghi fitopatogeni vi è una prima fase di crescita chemiotattica in cui il micoparassita dirige la sua crescita rispetto a un gradiente chimico prodotto dall'ospite. Nel riconoscimento *Trichoderma*-ospite, il fungo rilascia esochitinasi ed endochitinasi che degradano la parete cellulare del fungo bersaglio; successivamente il fungo entra in contatto con le ife dell'ospite circondandole e formando una struttura simile ad unicini ed appressori; con rilascio di enzimi litici (chitinasi e glucanasi) e di sostanze antibiotiche.

L'effetto combinato di tutti questi processi determina la completa degradazione del fungo bersaglio (Elad *et al.*, 1999).

I funghi del genere *Trichoderma* colonizzano le radici della pianta pur non manifestando patogenicità. Essi causano effetti benefici soprattutto per le piante che vedono accrescere sia la loro parte aerea che radicale (Tucci *et al.*, 2011), con conseguente incremento nell'accumulo di nutrienti (Azarmi *et al.*, 2011). Al momento della colonizzazione le ife del *Trichoderma* si avvolgono attorno ai peli radicali e successivamente si verifica la penetrazione delle stesse nell'epidermide della radice, attraverso la secrezione degli enzimi litici. Le cellule della pianta subiscono dei cambiamenti caratterizzati dalla deposizione di callosio e lignina sulle pareti e a seguire si ha un'induzione di enzimi idrolitici, un incremento dell'attività di perossidasi e un aumento di composti fenolici (Yedidia, 2000; Alfano *et al.*, 2007).

La capacità di *Trichoderma* di stimolare la resistenza sistemica in pianta è stata studiata mediante analisi microarray di piante di *Solanum lycopersicum* trattate con *Trichoderma* 382. L'analisi ha evidenziato l'induzione di geni associati alla SAR come le PR-5, mentre influenzati nella loro espressione, associati al pathway dell'acido jasmonico come ad esempio *lox1ed etr1* (Alfano *et al.*, 2007). L'attivazione di geni del pathway del SA e JA è stata riscontrata in esperimenti dove piante di pomodoro trattate con *Trichoderma* sono state infettate dal fungo *Botrytis cinerea*. L'analisi di espressione genica ha rivelato che l'interazione pianta-*Trichoderma* in assenza del patogeno induce la produzione di PR protein (PR1b1 e PR-P2) che indicano una prima reazione di difesa della pianta. Dopo il trattamento con *Botrytis* le piante attivano ulteriori *pathway* di risposta, inclusi geni regolati dal jasmonato (Tucci *et al.*, 2010) risultando più resistenti al patogeno. Per tali motivi negli ultimi anni, lo studio delle risposte verso tale fungo e le molecole da esso prodotte è stato approfondito per la ricerca di strategie alternative ed ecologiche utili per le colture agrarie.

1.5.1 Le idrofobine

Le idrofobine sono una classe di proteine prodotte da funghi filamentosi aventi proprietà specifiche: sono molecole anfifiliche con un *pattern* caratteristico di 8 residui di cisteina impiegati nella formazione di 4 ponti disolfuro importanti per la corretta formazione della struttura tridimensionale (Whiteford e Spanu 2002). Si differenziano tra di loro in base al loro grado di solubilità in classe I e II:

- Classe I: presente principalmente in Basidiomiceti e negli Ascomiceti si dissolvono solo in acidi forti (Wang *et al.*, 2010; Seild-Seiboth, 2011; Sunde *et al.*, 2008; Kershaw *et al.*, 1998).
- Classe II: presente solo in ascomiceti si dissolvono in solventi organici diluiti. (Wang *et al.*, 2010; Seild-Seiboth, 2011; Sunde *et al.*, 2008; Kershaw *et al.*, 1998)

Tali proteine sono determinanti in processi di morfogenesi come la sporulazione, la formazione di corpi fruttiferi e strutture infettive, inoltre, la presenza di cisteine le rende simili a fattori di avirulenza di funghi fitopatogeni quali *Avr9* e *Avr4* di *C. fulvum*. Secrete nello spazio extracellulare, circondano il fungo e conferiscono idrofobicità all'ifa fungina modulando così l'interazione fungo-fungo e fungo-pianta (Linder *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2011). La prima idrofobina fu identificata e purificata nel 1991 da *Schizophyllum commune* (SC3). Tale proteina di basso peso molecolare (10 kDa), mostrava la capacità di formare aggregati nell'interfaccia aria-acqua una volta secreta nel mezzo (Linder *et al.*, 2005, Sunde *et al.*, 2007, Kershaw e Talbot 1998).

Le idrofobine sono secrete come monomeri dall'ifa fungina, si autoassemblano posizionandosi nell'interfaccia aria-acqua con la parte idrofobica rivolta verso l'esterno e quella idrofilica rivolta verso il fungo. Durante la crescita fungina l'ifa emerge nell'aria permettendo alle idrofobine di legarsi ad essa. Il self-assemblamento è importante per il sviluppo del fungo. E' stato infatti osservato che mutanti *SC3⁻* sono incapaci di aderire alle superfici idrofobiche, inibendo la normale crescita del fungo (Kershaw and Talbot. 1998). Esse sono tra le più importanti proteine strutturali implicate nella morfogenesi cellulare e nella promozione della patogenesi, agendo come tossine o attaccando la superficie dell'ospite generando segnali morfogenici (Kim *et al.*, 2005, Wosten 2001, Kershaw and Talbot 1998). Come tossine esse riescono a sopprimere i sistemi di difesa, promuovere la necrosi cellulare, modificare le strutture delle membrane cellulari ed infine stimolare il rilascio di fitoalessine (Müller *et al.*, 2008). La Cerato-ulmina (CU), idrofobina di classe II prodotta da *O. ulmi* e *O. novoulmi*, si localizza sulla superficie del fungo riuscendo ad

alterare la permeabilità della membrana plasmatica delle cellule dell'ospite ed è stato dimostrato che il suo assorbimento favorisce l'instaurarsi della patologia (Del sorbo, 2000). La cerato-platanina (CP) da *Ceratocytis fimbriata*, patogeno del platano, è capace di auto aggregarsi e di elicitare risposte di difesa localizzate in tessuti di piante ospiti e non ospiti. Per tali motivi, lo studio delle idrofobine può essere utile per una migliore comprensione delle interazioni tra i geni R-Avr con lo scopo di contenere le popolazioni patogene.

2 SCOPO DELLA TESI

Lo studio di molecole provenienti da antagonisti naturali di agenti biotici offre nuove opportunità per l'identificazione di molecole aventi attività pesticida o biostimolante per la difesa delle colture agrarie. Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di studiare i geni *TnBVank1* ed *Htr1*, entrambi provenienti da due antagonisti naturali.

Il gene *TnBVank1* proviene dal virus simbiote del parassitoide *Toxoneuron nigriceps* e risulta essere implicato nell'inibizione della risposta immunitaria di larve di *Heliothis virescens* in seguito alla parassitizzazione. Sono state così prodotte piante di tabacco esprimenti il gene virale e dati preliminari hanno rivelato che larve di lepidottero alimentate su piante transgeniche presentavano un ridotto accrescimento rispetto a larve alimentate su piante controllo. Tale effetto potrebbe essere attribuito all'attività della proteina che traslocata nella cavità emocelica dell'insetto svolge la sua attività inibitoria o all'interazione della stessa con proteine di difesa prodotte dalla pianta in seguito ad elicitazione. A tale scopo è stato effettuato uno studio trascrittomico su piante esprimenti il gene esogeno in assenza ed in presenza di elicitazione ed i risultati ottenuti sono stati verificati mediante saggi biologici.

Il secondo gene in esame è *Htr1* e proviene da funghi del genere *Trichoderma*, antagonista di fitopatogeni. Tale gene codifica per l'idrofobina Htr1 e risultati preliminari hanno mostrato la capacità di tale proteina di attivare le difese endogene in pianta. Per tale motivo *Htr1* è considerato un gene candidato per la protezione delle colture agrarie. Per studiare il ruolo del gene *Htr1* nella difesa in pianta contro stress biotici, sono state prodotte piante di *Solanum lycopersicum* esprimenti tale gene sotto il controllo di un promotore inducibile. Tali piante sono state caratterizzate sia a livello fenotipico che a livello molecolare.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Descrizione allevamento di piante esprimenti il gene *TnBVank1* di *Toxoneuron nigriceps Bracovirus*

I materiali utilizzati sono linee transgeniche di *N. Tabacum* cv *Samsun*, genotipo NN trasformate con il gene *TnBVank1* proveniente da *Toxoneuron nigriceps Bracovirus*. I genotipi transgenici, già disponibili in laboratorio, sono stati selezionati mediante germinazione dei semi su mezzo selettivo utilizzando il seguente protocollo:

- Sterilizzazione di 100 semi in 1ml di etanolo al 70% per 2'
- Sostituzione di etanolo 70% con candeggina commerciale all'1,5% per 15'
- Lavaggio dei semi per 4 volte con acqua sterile autoclavata
- Posizionamento dei semi in piastre Petri contenenti MS30 (4,3 g /l MS Sali minerali, 30 g/l saccarosio, 8 g/l microagar pH 5.8) con l'aggiunta di Kanamicina 100 mg/l
- Posizionamento delle piastre al buio per circa 7 giorni e successiva esposizione alla luce (24°C con fotoperiodo 16 ore di luce e 8 buio).

Le piante ottenute sono state trasferite in plateau e successivamente in vaso. Il materiale sia in vivo che in vitro è stato allevato in condizioni di luce e temperatura controllati (24°C con illuminazione 100000 lux con fotoperiodo di 16 ore luce e 8 buio).

3.2 Analisi dati Microarray

Dati microarray già disponibili nel laboratorio della Prof. Rao sono stati ottenuti da piante *wild type* e ANK1 capitozzate ed elicitate con capsiceina per 24 ore, al termine delle quali è stato raccolto il tessuto vegetale. L'analisi microarray è stata effettuata mediante piattaforma Combimatrix, mentre l'annotazione funzionale è stata eseguita utilizzando il programma "Blast2GO".

3.2.1 Analisi bioinformatiche

Le sequenze dei Tentative Consensus (TC) dei geni modulati, sono state ricavate dal sito Gene Index Project (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>). La ricerca delle similarità di sequenze con le proteine di *Arabidopsis thaliana* aventi un E value < 10^{-6} sono state ottenute mediante l'utilizzo del software Blastx utilizzando il database "Non redundant sequence proteins (nr)" di NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/x>). Dei geni ricercati in banca dati, è stata identificata la proteina avente maggiore identità di sequenza ed E-value. La sequenza proteica è stata in seguito convertita in sequenza nucleotidica di *Arabidopsis* mediante l'utilizzo del sito TAIR (<http://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/>). L'annotazione computazionale dei dati è stata effettuata con il software Blast2GO v.2.3.6 (<http://www.blast2go.org>).

3.3 Analisi di espressione genica: elicitazione con *Spodoptera littoralis*

I genotipi NN e trasformanti ANK1 e ANK4 sono stati sottoposti a saggio di induzione con *Spodoptera littoralis*. Larve di *Spodoptera* sono state posizionate su foglie di tabacco dove si sono alimentate per un ora. Prelievi di foglie attaccate dalle larve e quelle distali sono stati effettuati al tempo "0" (piante controllo), dopo 2, 4, 8 e 24 ore dall'induzione. La quantità di trascritto è stata analizzata mediante analisi quantitativa Real-Time RT-PCR dell'inibitore di proteasi *PinII*. I primer utilizzati per l'analisi del gene *PinII* sono stati PinII Fw e PinIIRw (TGTAACGCAGACAAGGGTTGC; AAGCAGCACTTTGAGGCTCC).

La reazione è stata allestita in un volume totale di 10ul contenenti 5 µl di Syber Green Master mix (Quiagen), 1 µl di cDNA (1:20), 300mM Primer. Il ciclo utilizzato è stato il seguente:

- denaturazione a 94°C per 30''
- 95°C per 45'', 58°C per 60'' e 72°C per 20'', ripetendo tale ciclo per 40 volte.

Il ciclo di amplificazione prevede due step preliminari di 50°C per 2' e di 95°C per 10' e la macchina è stata settata per registrare i dati di fluorescenza nella fase di appaiamento dei

primer. Ogni amplificazione è stata ripetuta tre volte e i valori di fluorescenza sono stati poi analizzati dal software Rotor-Gene 6000 Software Series 1.7. La quantificazione relativa dell'espressione dei geni è stata effettuata secondo il metodo del ΔC_t (Livak e Schmittgen, 2001) dove:

$$\Delta C_t = C_t \text{ del gene target} - C_t \text{ controllo endogeno}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ campione} - \Delta C_t \text{ calibratore}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

L'actina di *N. tabacum* è stata usata come riferimento endogeno e usata per normalizzare l'espressione dei geni di interesse in Tabacco mediante l'utilizzo di primer ActinaFW e ActinaRW (ActinaFw AGGGTTTGCTGGAGATGATG; ActinaRw CGGGTTAAGAGGTGCTTCAG).

3.4 Saggi Biologici con *Spodoptera littoralis*

Piante di tabacco *wild type* (NN) e trasformanti ANK1 e ANK4 sono state sottoposte a saggi di resistenza al lepidottero *Spodoptera littoralis*. I biosaggi sono stati condotti presso i laboratori del dipartimento di entomologia dell'università di Napoli "Federico II". Le condizioni di allevamento del notturne sono state: temperatura di 25°C \pm 1 °C e fotoperiodo di 16h luce e 8h di buio. Larve di *Spodoptera* sono state preliminarmente alimentate con tabacco *wild type* per standardizzare la fisiologia digestiva. Successivamente al raggiungimento del secondo stadio larvale, sono state prelevate 192 larve che sono state divise a gruppi di 64 e ciascun gruppo è stato alimentato con foglie di ogni genotipo in esame. Il saggio ha avuto la durata di circa 35 giorni a giorni alterni, durante l'intero periodo di allevamento, è stato valutato il tasso di sopravvivenza delle larve. Il biosaggio è stato portato avanti fino al raggiungimento dello stadio di crisalide.

3.5 Trasformazione stabile del gene *Htr1* in *Solanum Lycopersicum*

3.5.1 Plasmide utilizzato

Il plasmide pBIN19 (Bevan, 1984) è stato ingegnerizzato per l'espressione inducibile del gene *Htr1* isolato da *Trichoderma spp* con l'ottenimento del plasmide pBin19::HytraETOH#1-SP mostrato in Fig.3.1.

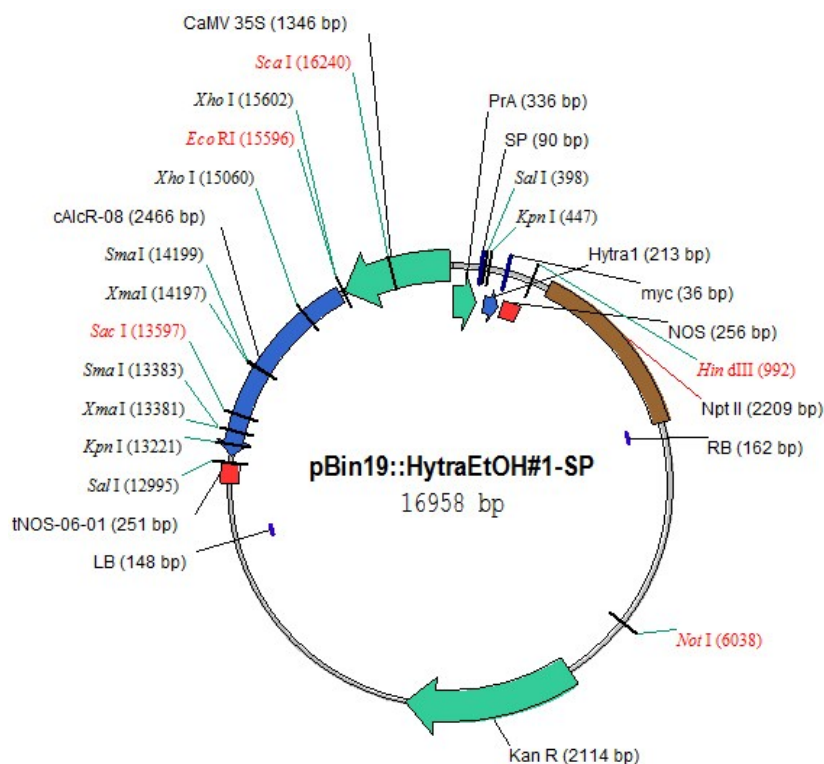


Fig.3.1: Mappa del vettore pBin19::HytraETOH#1-SP utilizzato per la trasformazione. Il pBin19::HytraETOH#1-SP presenta all'interno della sequenza del T-DNA delimitata da LB (*Left Border*) e RB (*Right Border*), un gene di resistenza a kanamicina, una sequenza di cDNA codificante per il gene *Htr1* sotto il controllo del sistema inducibile da etanolo AlcR-AlcA.

3.5.2 Substrati utilizzati per la trasformazione

I substrati utilizzati per la trasformazione sono riportati in tabella 1 e sono stati preparati secondo le indicazioni presenti nel catalogo Duchefa (Catalogue 2010-2012).

	Ms 30	TRI I	GCF 10	GCF11	TRI 2
Sali MS	4.3 g/L	2.2 g/L	4.3 g/L	4.3 g/L	2.2 g/L
Tiamina	0.4 mg/L	0.2 mg/L	0.4 mg/L	0.5 mg/L	0.2 mg/L
Myo-Inositolo	100 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	50 mg/L
Glicina	-	-	-	2 mg/L	-
Piridossina	-	-	0.5 mg/L	0.5 mg/L	-
Acido folico	-	-	-	0.5 mg/L	-
Biotina	-	-	-	0.05 mg/L	-
Zeatina riboside	-	-	1.5 mg/L	1.9 mg/L	-
NAA	-	-	-	-	0.1 mg/L
IAA	-	0.2 mg/L	0.2 mg/L	-	-
Ancymidol	-	-	-	-	0.5 mg/L
Acido nicotinico	-	-	0.5 mg/L	4.9 mg/L	-
Saccarosio	30 g/L	15 g/L	30 g/L	30 g/L	15 g/L
Carbenicillina	-	-	500 mg/L	500 mg/L	250 mg/L
Kanamicina	-	-	50±10 mg/L	50±10 mg/L	25 mg/L
Agar	-	8 g/L	8 g/L	8 g/L	8 g/L
pH	5.8	5.9	5.9	5.9	5.9

Tabella 1.: Substrati utilizzati per la trasformazione di pomodoro.

3.5.3 Sterilizzazione e germinazione dei semi

- Sterilizzazione di 2 grammi di semi con etanolo 70% per circa 5'
- Sostituzione della soluzione con etanolo 70% fresco per 1'
- Lavaggio dei semi con una soluzione di candeggina commerciale 10% ed SDS 0,1% per 10'
- Lavaggio dei semi per 5 volte con acqua sterile autoclavata.
- Posizionamento dei semi a distanza di ~0,5cm contenenti TRI I e lasciar germinare i semi in camera di crescita a 25°C e 80-100µE con fotoperiodo 16 ore di luce
- Utilizzo delle piantine quando i cotiledoni sono ben evidenti e non sono presenti foglie vere (circa dopo 7-8 giorni)

3.5.4 Coltura di cellule di *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

- Preinoculo di una colonia singola di *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Hoekema *et al.*, 1983) in 10mL di AB (contenente, per litro: 3 g K₂HPO₄, 1 g NaH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0,3 g MgSO₄ - 7H₂O, 0,15 g KCl, 0,01 g CaCl₂, 2,5 mg

FeSO₄ 7H₂O, 0,5% glucose) (Chilton *et al.*, 1974) con 500mg/L streptomina e 50 mg/L kanamicina ed incubazione a 28°C per 16 ore in agitazione a 180rpm

- Inoculo di 3mL in 50mL di AB con gli opportuni antibiotici e aggiunta di glucosio al 2%, incubazione a 28° a 180rpm per 16 ore
- Centrifugazione a 4000rpm per 10' a temperatura ambiente in tubi (Falcon)
- Risospensione in 25mL di AB e centrifugazione come al punto precedente
- Risospensione in 25mL di AB e centrifugazione come al punto precedente
- Risospensione in 10mL di AB e misurazione dell'assorbanza a 600 nm allo spettrofotometro di 500µl di coltura in 500µl di AB
- Risospensione del pellet fino al raggiungimento di un'assorbanza di 0,6

3.5.6 Co-coltivazione di espianti e *A. tumefaciens*

- Taglio trasversale dei cotiledoni delle piantine in frammenti di circa 5mm e immersione immediatamente di 32 espianti che non vanno a contatto con l'Agrobatterio in AB liquido in piastre Petri e che vengono poi posizionati su una piastra con GCF10 e un dischetto di carta Whatman come controllo
- Per i restanti espianti si prosegue con la loro immersione in una piastra Petri contenente la sospensione di Agrobatterio ed incubazione per 10'
- Trasferimento degli espianti su 3dischetti di carta Whatman e posizionamento con la pagina superiore rivolta in basso sul terreno GCF10 con 375µM acetosiringone e un disco di carta Whatman sterile
- Chiusura delle piastre con la pellicola ed incubazione in cocoltivazione per 2 giorni al buio a 26°C

3.5.7 Coltura degli espianti

- Trasferimento degli espianti con la faccia superiore verso il basso in piastre di GCF10 con 500 mg/L carbenicillina e 40 mg/L kanamicina
- Trasferimento di 16 espianti di controllo su GCF10 (controllo rigenerazione) e 16 su GCF10 con 500 mg/L carbenicillina e 40 mg/L kanamicina (controllo selezione)

- Trasferimento di tutti gli espianti su terreno di selezione fresco dopo una e due settimane
- Trasferimento degli espianti su terreno di selezione fresco dopo due settimane
- Alla formazione dei primi calli dopo circa tre settimane, trasferimento di questi ultimi su terreno GCF11 con 500mg/L carbenicillina e 40mg/L kanamicina

Il “controllo selezione” assicura l’efficacia dell’ antibiotico utilizzato nel selezionare gli espianti. Il “controllo rigenerazione” assicura, invece, che le componenti del substrato colturale impiegato favoriscano la callogenesi e la formazione di germogli. Tali controlli, quindi, consentono di monitorare la capacità selettiva dell’antibiotico utilizzato e lo sviluppo di germogli nel substrato di coltura.

3.5.8 Radicazione dei germogli e trasferimento in vivo

- Alla formazione dei germogli veri, dopo circa 4 settimane, trasferimento su mezzo TRI 2 con 250 mg/L carbenicillina e 25 mg/L kanamicina
- Trasferimento su substrato fresco ogni 20-30 giorni
- Alla formazione di un buon apparato radicale, trasferimento delle piantine in *plateau* di polistirolo chiusi da una pellicola trasparente per ridurre lo stress evapotraspirativo
- Trasferimento in vasi di terra in camera di crescita dopo circa 10 giorni dal trasferimento nel *plateau*

3.5.9 Allevamento e propagazione del materiale transgenico

Il materiale vegetale è stato allevato come indicato di seguito:

- Piante trasferite in vivo in camera di crescita climatizzata a 24°C, con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio, in condizioni di luminosità di 5000 lux.
- Dopo un periodo di circa 2 settimane, trasferimento in vasi di 9 cm di diametro contenenti una miscela di terreno sterile e substrato di tipo S (Florigard)
- A crescita avvenuta e in seguito alla maturazione delle bacche, estrazione dei semi trattamento con HCl 3⁰/₀₀ per una notte
- Allontanamento dell’HCl mediante diversi lavaggi con acqua sterile

- Conservazione dei semi in una camera climatizzata a 4°C.

L'ottenimento delle generazioni successive ha previsto:

- Germinazione dei semi su dischetti di carta Whatman imbevuti di acqua sterile all'interno di piastre Petri, in camera di crescita al buio a 25°C per circa 5 giorni
- Allo spuntare della radichetta e dei cotiledoni, trasferimento in *plateau* di polistirolo e successivamente in vaso, come descritto precedentemente.

3.6 Caratterizzazione molecolare e fenotipica di piante HTR1

Le piante ottenute dalla trasformazione sono state sottoposte ad uno *screening* molecolare che ha previsto: estrazione del DNA genomico, quantificazione e selezione delle piante trasformate mediante amplificazione del gene *Htr1*

3.6.1 Estrazione di DNA e quantificazione

L'estrazione di DNA è stata effettuata seguendo il protocollo Fulton (Fulton *et al.*, 1995). Prelevati 100mg di tessuto vegetale, sono stati macerati in azoto liquido e trasferiti in eppendorf. Il materiale è stato poi risospeso in 750µl di buffer di estrazione composto da :

- 25ml di *DNA Extration buffer* (0.35M Sorbitolo, 0.1M TRIS, 5mM EDTA pH 7.5)
- 25 ml di *Nuclei Lysis buffer* (0.2M tris, 0.05M EDTA, 2 M NaCl, 2% CTAB)
- 10 ml di *Sarkosyl* (5% p/v)
- 0,2g di Bisolfito di Sodio

In seguito i campioni sono stati:

- Incubati a 65°C per 60'.
- Addizionati con 1ml di cloroformio e centrifugati per 5' a 13000 rpm
- Prelevati 600µl di surnatante e trasferiti in nuovi tubi eppendorf da 1,5ml
- Addizionati con isopropanolo freddo in un volume 1:1 e miscelato
- Centrifuga a 13000 rpm per 5'
- Addizionati con etanolo 70% e centrifuga 13000 rpm per 5'
- Risospensione del pellet in 50µl di H₂O sterile

Il DNA estratto è stato quantificato attraverso elettroforesi su gel agarosio allo 0,8% (p/v) in TAE 1X (40mM Tris acetato, 1mM EDTA) e colorazione con 2,5µl di Bromuro di

etidio (10mg/ml; Fluka). Sono stati caricati 2µl di DNA genomico e confrontati con quantità note del DNA del fago λ (Promega) (50ng, 100ng e 200 ng)

3.6.2 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Lo screening della popolazione è stato effettuato verificando la presenza o assenza del gene *Htr1* in pianta mediante analisi PCR. L'amplificazione del DNA, estratto è stata effettuata utilizzando primer specifici per il gene *Htr1* (Htr1Fw: GCTGTCTGCCCTACCGGC; Htr1Rw: CTGGGTGCCGATGGGCTTC), in un volume di reazione di 20 µl contenenti 50 ng di DNA, 2 µl GoTaq Buffer 5X (Promega), 0,4 µl di dNTP 25Mm, 1 µl di entrambi i primer 10 µM e 0,08 µl di GoTaq 5 U/µl (Promega). Il ciclo di amplificazione impiegato è stato il seguente:

- denaturazione a 95°C per 5'
- 30 cicli caratterizzati da un fase di denaturazione a 95°C per 45'', una fase di annealing a 58°C per 45'', una fase di estensione a 72°C per 45''
- estensione a 72 °C per 7'

I prodotti dell'amplificazione sono stati visualizzati su gel di agarosio allo 1,5%(p/v) con colorazione mediante Bromuro di Etidio (2,5µl di 10 mg/ml; Fluka)

3.6.3 Quantificazione con Qubit

La quantificazione del DNA estratto è stata eseguita secondo la seguente procedura:

- Preparazione degli standard: è stata preparata la *Working Solution* (WS) diluendo il *Qubit dsDNA BR Reagent* 1:200 in *Qubit dsDNA BR buffer*. Per ciascuno dei 2 standard sono stati impiegati 10µL e 190µL di WS. Per ogni campione sono stati utilizzati 10µL di DNA e la restante parte di WS fino ad un Volume finale di 200 µL.
- Sia i campioni che gli standard sono stati vortexati per 2-3'' e incubati a T_{amb} per 2'. Dopo aver calibrato la macchina con gli standard si è proceduto alla lettura dei campioni calcolando la loro concentrazione mediante la formula:

$$[\mu\text{g/mL}] = [\text{Lettura Qubit}] * \left(\frac{200}{\mu\text{L di campione letti}} \right)$$

3.6.4 Southern Blot: preparazione della sonda

La sonda utilizzata è stata sintetizzata amplificando il gene *Htr1* presente nel plasmide pBin19::HytraETOH#1-SP (Fig. 3.1), utilizzando primer Htr1Fw e Htr1Rw(GCTGTCTGCCCTACCGGC; CTGGGTGCCGATGGGCTTC) e dNTPs marcati con digossigenina (PCR-DIG labeling mix Roche).

La reazione di amplificazione è stata condotta in un termociclatore, in un volume finale di reazione di 50 µl contenenti: 10 ng di DNA plasmidico, 0,5 µM di ciascun primer, 200mM di PCR DIG Labeling mix, 1X Buffer e 0,4 U di Taq Polimerasi (Promega). Le condizioni di temperatura utilizzate per le reazioni di amplificazione sono:

- denaturazione a 95°C per 5';
- 30 cicli caratterizzati da un fase di denaturazione a 95°C per 45'', una fase di annealing a 58°C per 45'', una fase di estensione a 72°C per 45''
- di estensione a 72 °C per 7'.

La reazione di amplificazione è stata visualizzata mediante elettroforesi su gel di agarosio all' 1.5%(p/v) con 2,5 µl di Bromuro di Etidio (10mg/ml; Fluka)

3.6.5 Digestione del DNA genomico e trasferimento sul filtro

- 5µg di DNA genomico sono stati digeriti con l'enzima di restrizione *EcoRI* con miscela di reazione con volume finale di 120 µl contenenti: 5µg di DNA , 1X BufferH (Promega), 0,5 µl di enzima di restrizione *EcoRI* (Promega) e 0,16ng/µl di RNAsi (Invitrogen) e seguente incubazione a 37°C per 4 h
- Il DNA digerito è stato trattato con sodio acetato 3M pH 5.5 (1/10 del volume di reazione) ed etanolo al 100% (2 volumi della miscela di reazione)
- Incubazione per tutta la notte a -20°C
- Centrifuga a Tamb per 4' a 14000 rpm
- Pellet risospeso in acqua e Dye 1X, ottenendo un volume finale di 50µl
- Preparato un gel di agarosio allo 0,7%(p/v)
- Applicata una differenza di potenziale di 75-80 V per circa 2 ore
- Visualizzazione del gel ai raggi UV.
- Due lavaggi di 15' con una soluzione di denaturazione (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl)
- Due lavaggi di 15' con una soluzione di neutralizzazione (0.5M Tris-HCl, pH 7.5, 3M NaCl).

- Trasferimento del DNA su un filtro di nylon con soluzione 20X SSC (3M NaCl, 0.3 M citrato di sodio pH 7) per tutta la notte

3.6.6 Pre-ibridazione e ibridazione della membrana

- Pre-ibridazione sul filtro per due ore a 42°C con una soluzione Dig Easy Hyb Granules (Roche)
- Ebollizione di 5µg di sonda per 10' e aggiunta alla Dig Easy Hyb Granules
- Ibridazione per tutta la notte a 42°C.
- Lavaggi con Washing Solution 2X (2X SSc, 0,1%SDS) a T_{amb} per 10' (Ripetuto per due volte)
- Lavaggi con Washing Solution 0,5X(0,5 X SSC, 0,1% SDS) per 30' a 68°C(Ripetuto per due volte)
- Lavaggio in Washing Buffer (0,3% w\v di Tween 20 diluito in acido maleico 0.1 M) (acido maleico: 0,1 M acido maleico, 0,15 M NaCl, pH 7,5) per 5',
- Lavaggio in Blocking Solution1X (Acido Maleico e Blocking Solution 10X) per 30'
- Diluizione dell' Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (1:20000 in Blocking Solution).
- Lavaggio del filtro di nylon per 15' con Washing Buffer (100 mL)(Ripetuto per due volte)
- Lavaggio della membrana con Detection Buffer (100 mM Tris-HCl, 100mM NaCl) per 5'.
- Aggiunta del substrato chemiluminescente CDP-star (1:200 in Detection Buffer)
- Visualizzazione del risultato mediante lastra autoradiografica con un'esposizione di 2 ore.

3.6.7 Analisi fenotipica

Le piante risultate positive all'analisi PCR e caratterizzate mediante Southern blot sono state oggetto di analisi fenotipica sia della parte aerea che radicale della pianta trasformata rispetto al controllo. I parametri oggetto di misurazione sono stati la lunghezza del fusto, la morfologia fogliare e le dimensioni delle radici.

3.6.8 SDS-Page e Western blot

3.6.8.1 Estrazione proteine totali da tessuti vegetali

L'estrazione delle proteine totali è stata effettuata mediante la seguente procedura:

- Macerazione del tessuto con azoto liquido e trasferimento di 0,6g di tessuto in tubi eppendorf da 1,5ml
- Aggiunta di 400µl di buffer di estrazione (UREA 6M, Tris-HCl pH 7.5 50mM, NaCl 50mM ed EDTA 5mM) e agitazione con vortex per 2'
- Centrifuga a 13200 rpm per 10' a 4°C
- Prelevato il surnatante e trasferito in nuovi tubi
- Centrifuga a 13200rpm per 10' a 4°C
- Quantificazione delle proteine totali mediante saggio spettrofotometrico utilizzando l'Eppendorf Biophotometer con metodo Bradford (Bradford 1976) e la Bovine Serum Albumin (BSA) come proteina standard.

3.6.8.2 SDS-PAGE

L'analisi SDS-PAGE e western blot è stata effettuata con le seguenti modalità:

- Preparato un Resolving gel 15% (8ml di acrilammide al 30%, 5ml di 1,5M Tris pH8.8, 0,2 ml di SDS 10%, 0,2 Ammonio persolfato 10%, 8 µl di Temed , fino a 20 ml con acqua)
- Preparato lo stacking gel 5% (670µl di acrilammide al 30%, 500 µl di 1,0M Tris pH6.8, 40µl di SDS 10%, 40µl Di Ammonio persolfato 10%, 4µl di Temed , fino a 4ml con acqua).
- 60 µg di proteine totali sono state addizionate al "loading dye "(0,1% Blu di Bromofenolo, 5mM EDTA, 200mM Tris pH 8.8, 1M saccarosio , 10%SDS e 1M DDT), riscaldati a 100°C per 10'
- Preparato il buffer per la corsa elettroforetica 5X-Tris Glycine-SDS (94g/l glicina, 15,1g/l Tris, 50ml di 10% SDS pH 8.8)

La corsa elettroforetica è stata eseguita in Mini Protean Tetra Cell (Bio RaD) a 70 Volts per 30' e poi 100 Volts per circa 1h. Lo standard proteico utilizzato è stato il Precision Plus (Bio RaD).

Per l'analisi del profilo proteico il gel è stato posto in 50ml di Comassie Blu (Comassie Blu 1,2g/l, Metanolo 300ml/l, Acido acetico 60ml/l, H₂O a volume finale) per tutta la notte. Il giorno seguente si procede alla decolorazione mediante lavaggi con Fixer Destainer (Metanolo 50ml, Acido acetico 50ml).

3.6.8.3 Electroblothing e Western Blot

Il gel è stato inserito nella cassetta per l'elettroblothing con una membrana di nitrocellulosa Trans-Blot Transfer Medium (Bio Rad) e all'elettroblothing buffer (50mM Trizma, 380 mM Glycine, 10% metanolo), applicando una differenza di potenziale di 100 volts per circa 1h. Successivamente il protocollo ha previsto:

- Fissaggio delle proteine su filtro con una soluzione di “blocking” per 1h contenente (5% latte in polvere, 0,5% Tween 20 in PBS1X (87g NaCl, 22,5 g di Na₂HPO₄, 2g KH₂PO₄ portato a pH7.4).
- Incubazione della membrana per 3h a T_{amb} con l'anticorpo primario anti-myc (Santa Cruz), diluito nel rapporto 1:500 in 15ml di soluzione blocking
- 3 lavaggi con PBS1X e 0,5% Tween20 per 15'
- Aggiunta la soluzione di blocking solution contenente l'anticorpo secondario (diluizione 1:2000 anti-rabbit, Amersham) per 1h.
- 3 lavaggi con PBS1X e 0,5% Tween20 (3 volte) per 15'
- 3 lavaggio del filtro con PBS1X per 10'
- La membrana è stata posta a contatto con la soluzione ECL (GeHealthcare) e successivamente con una lastra Kodak per un tempo di 40 min.

3.7 Quantificazione del livello di trascritto in piante esprimenti

Htr1 e TnBVank1.

3.7.1 Midi-preparazioni plasmidiche

Cellule di *Escherichia Coli* contenenti il plasmide **pDE::Sp-ank-myc** (Fig. 3.2) e **pBin19::HytraETOH#1-SP** (Fig. 3.1) sono state incubate a 42°C per 1' e 30'' e lasciate in ghiaccio per 10', dopo l'aggiunta di 800ml di LB (Tryptone 10g/l, Estratto di lievito 5g/l, NaCl 10g/l pH 7.0).

Le cellule sono state incubate per 1h a 37°C in agitazione. La miscela è stata prelevata e piastrata interamente su mezzo selettivo LB con kanamicina (100 mg/ml).

Con ansa monouso ogni singola colonia è stata inoculata in 3ml di LB, i tubi sono stati posti in agitazione a 37°C tutta la notte. L'estrazione del DNA plasmidico, (Birnboim e Doly, 1979) è stata effettuata tramite un protocollo di lisi alcalina che prevede le seguenti fasi:

- Prelievo 1.5ml e centrifuga per 30'' a 13000 rpm.
- Risospensione del pellet in 100µl di soluzione SOL I (50 mM glucosio, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) e agitazione
- Incubazione in ghiaccio per 10'
- Aggiunti 200µl di soluzione SOL II (0,2 M idrossido di sodio e 1% SDS), agitazione per inversione
- Incubazione in ghiaccio per 5'
- Aggiunti 150µl di soluzione SOL III (60% 5M acetato di potassio e 11,5% acido acetico) e agitazione per inversione
- Incubazione in ghiaccio per 5' e successiva centrifuga a 14000 rpm per 10' a 4°C
- Trasferimento del surnatante tubo eppendorf da 1,5 ml
- Aggiunta di 1/10 del volume di 3M sodio acetato (pH 7) e 3 volumi di etanolo al 100%
- Incubazione a -80°C per 5' e centrifuga per 10' a 13200 rpm.
- Eliminazione sovrnatante e lavaggio del pellet con etanolo al 70%
- Centrifuga a 14000rpm per 5'
- Risospensione del pellet in 50µl di acqua bidistillata sterile.

La quantificazione dei plasmidi estratti è stata effettuata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio allo 0,8%(p/v) in TAE 1X (40mM Tris acetato, 1mM EDTA) con 2,5 µl di

Bromuro di Etidio (10mg/ml; Fluka), in un volume totale di 12µl e DNA del fago λ come standard (200 ng , 400 ng, 800 ng).

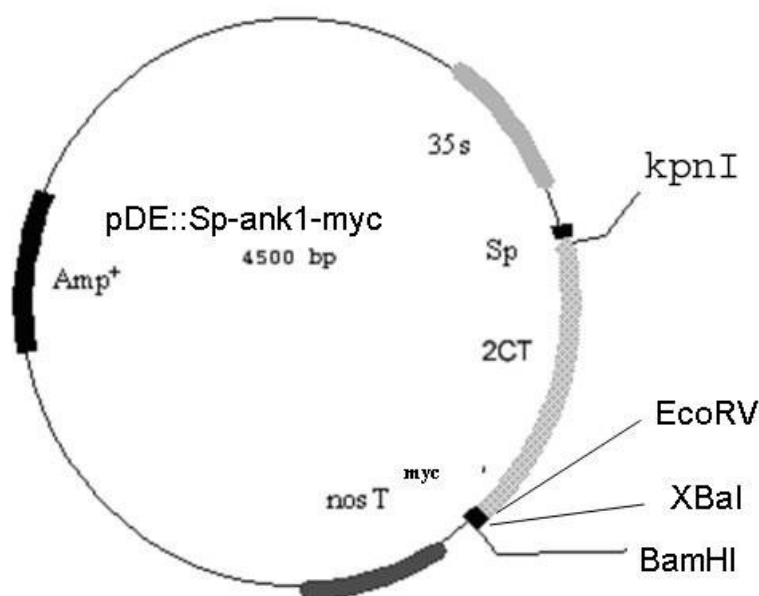


Fig.3.2: Mappa del vettore binario pDE::Sp-ank1-myc utilizzato per la quantificazione del gene *TnBVank1* e precedentemente utilizzato per la trasformazione genetica di tabacco.

3.7.2 Analisi PCR del plasmide estratto

10ng/µl del plasmide estratto sono stati analizzati mediante analisi PCR utilizzando primer specifici per i geni *TnBVank1* (Ank Fw: TAGCTGCTGCCTATGGAGGT; Ank Rw: GTCTTCTGGGCGAAGTCTTG) e *Htr1* (Htr1FW GCTGTCTGCCCTACCGGC; Htr1RW CTGGGTGCCGATGGGCTTC). La reazione di amplificazione è stata condotta in un termociclatore, in volume finale di reazione di 20µl contenenti: 50 ng di DNA, 2 µl GoTaq Buffer 5X (Promega), 0,4 µl di dNTP 25Mm, 1 µl di entrambi i primer 10 µM e 0,08 µl di GoTaq 5 U/µl (Promega).

Le condizioni di temperatura utilizzate per le reazioni di amplificazione sono:

- denaturazione a 95°C per 5'
- 25 cicli caratterizzati da un fase di denaturazione a 95°C per 45'', una fase di annealing (57°C per *TnBVank1* ;58°C per *Htr1*) per 45'', una fase di estensione a 72°C per 45''
- estensione a 72 °C per 7'.

Gli amplificati, sono stati visualizzati su gel di agarosio a 1,5% (p/v) con colorazione con 2,5 µl di Bromuro di Etidio (10mg/ml; Fluka)

3.7.3 Estrazione RNA da foglia

Il protocollo di estrazione di RNA prevede le seguenti fasi:

- Macerazione del tessuto con azoto liquido
- Trasferimento di 0,5 g di tessuto in tubi da 2ml contenenti 750µl di buffer di estrazione RNA autoclavato (100 mM Tris-Cl pH 8,5, 100mM cloruro di sodio, 20 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS) e 750µl di fenolo/cloroformio 1:1 (v/v)
- Agitazione su vortex per 1'
- Centrifuga per 5' a 13200 rpm a 4°C
- Trasferimento del surnatante in nuovi tubi da 2ml contenenti 750µl di fenolo/cloroformio e agitazione su vortex.
- Trasferimento del surnatante in tubi da 2ml contenenti 1ml di cloroformio e i agitazione manuale
- Centrifuga per 5' a 13200 rpm a 4°C
- Prelievo della fase acquosa e aggiunta di 750µl di isopropanolo
- Trasferimento in ghiaccio per 5' e successiva centrifuga a 4°C per 10' a 13200rpm
- Risospensione del pellet in 200µl di acqua DEPC 1⁰/₀₀ (dietilpirocarbonato) (SIGMA) sterile e 200ul di litio cloruro 4M incubando i campioni tutta la notte a 4°C
- Centrifugazione per 20' a 13200 rpm a temperatura ambiente
- Risospensione del pellet in 400 µl di acqua DEPC, 40µl di Sodio acetato 3M e 1ml di etanolo 100%, incubando per 10' a -80%
- Centrifuga a 13200rpm per 10' a 4°C
- Risospensione del pellet in 42µl di acqua DEPC.

La concentrazione di RNA e i rapporti A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} sono stati determinati mediante lettura spettrofotometrica utilizzando il Nanodrop. In seguito 5µg di RNA sono stati addizionati a 20µl di buffer denaturante (400 µl Formammide, 120µl formaldeide 37%, 5µl loading buffer 10X, 1.2µl di Bromuro di Etidio 10 mg/ml), trattati a 65°C per 5' e sottoposti a elettroforesi su gel di agarosio a 1,2% (p/v)

3.7.4 Trattamento con DNAsi e sintesi del cDNA

Contaminazioni di DNA sono state eliminate attraverso il trattamento dei campioni con DNAsi secondo la seguente procedura:

- 2µg di RNA totale estratto sono stati trattati con 1U di DNase Amplification GRade (Invitrogen) e 3 µl 10X DNase I Buffer
- Incubazione a Tamb per 15'
- Aggiunta di 1 µl di EDTA 25 mM ed incubazione a 65°C per 10'.

Il cDNA è stato sintetizzato utilizzando Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) seguendo il protocollo della casa produttrice. La sintesi del cDNA è stata verificata mediante reazione PCR utilizzando primer specifici per *l'elongation factor -1 alpha (EF-1α* Fw AAGCTGCTGAGATGAACAAG; *EF-1α* Rw GTCAAACCAGTAGGGCCAAA). La reazione PCR è stata allestita in un volume totale di 20µl contenenti 1µl di cDNA, 0,5mM primer, 0,2mM dNTP, 0,5U taq DNA polymerase (Go taq invitrogen) in 1X PCR Buffer (invitrogen). L'amplificazione è stata condotta utilizzando:

- 95°C per 5';
- 25 cicli caratterizzati da un fase di denaturazione a 94°C per 45'', una fase di annealing a 53°C per 45'', una fase di estensione a 72°C per 45'' ed infine una fase di estensione a 72 °C per 7'

I prodotti di amplificazione sono stati mostrati mediante gel di agarosio 1,2% (p/v) colorato con 2,5µl di Bromuro di Etidio (10mg/ml; Fluka).

3.7.5 RT-PCR

La reazione è stata allestita in un volume di 20 µl contenenti: 1µl di cDNA, 0.5mM primer (Ank Fw, Ank Rw e Htr1FW, Htr1RW), 0,2mM dNTP, 0,5U taq DNA polymerase (Go taq Promega) in 1X PCR Buffer (Promega). Le modalità di amplificazione sono descritte nel paragrafo 3.7.2

3.7.6 Real Time RT-PCR assoluta

L'analisi Real-Time RT-PCR assoluta è stata condotta su piante esprimenti il gene *TnBVank1* e *Htr1*, utilizzando il termociclatore Rotor-gene 6000 (Corbett Research). La reazione è stata allestita con la seguente modalità:

- Preparazione della standard curve, ottenuta con diluizioni seriali del plasmide (1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1000).
- Diluizioni 1:20 dei campioni

La reazione è stata allestita in un volume totale di 30 µl contenenti 15 µl di Syber Green Master mix (Qiagen), 1 µl del campione da saggiare e 300mM Primer specifici per i geni in analisi (RT-ANK Fw: AATGCACCCAACCAAACCT; RT-ANK Rw AGCACAGCCATTTCGCCA; RT-Htr1 FW: TCTTCTTCCAGGCCCACT; RT-Htr1RW: AGAACACCCTGCTTGGC). Il ciclo utilizzato è stato il seguente:

- denaturazione a 94°C per 30''
- 95°C per 45'', 58°C- 60°C (*TnBVank1* e *Htr1* rispettivamente) per 60'' e 72°C per 20'', ripetendo tale ciclo per 40 volte.

Il ciclo di amplificazione prevede due step preliminari di 50°C per 2' e di 95°C per 10' e la macchina è stata settata per registrare i dati di fluorescenza nella fase di appaiamento dei primer. Ogni amplificazione è stata ripetuta tre volte e i valori di fluorescenza sono stati poi analizzati dal software Rotor-Gene 6000 Software Series 1.7.

4 RISULTATI

4.1 PARTE I: Le piante di tabacco transgeniche per il gene *TnBVank1*

I materiali utilizzati, sono linee transgeniche di *N. Tabacum* cv *Samsun*, genotipo NN trasformate con il gene *TnBVank1* proveniente da *Toxoneuron nigriceps* *Bracovirus*. La sequenza del gene virale (500bp) codifica per una proteina di 155 aminoacidi con un peso molecolare di 17.5 KDa aventi tre domini anchirina. Il dominio anchirina la cui sequenza consenso è stata caratterizzata da Sedgwick e Smerdon (1999), è costituito da 33 aa, di cui 15 aa altamente conservati formanti due α -eliche antiparallele connesse a un motivo β -hairpin (Palek e Lambert, 1990). Il gene è stato inserito sotto il controllo di un promotore costitutivo 35S (CaMV virus del Mosaico del Cavolfiore) (Guilley *et al.*, 1982) e presenta al 3' una sequenza di 30 paia di basi (EQKLISEEDL) codificante per l'epitopo Myc per il quale è disponibile in commercio un anticorpo specifico monoclonale (Hilpert *et al.*, 2001) (Fig.4.1).

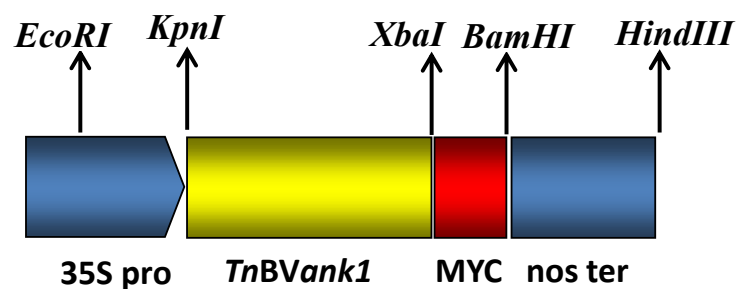


Fig. 4.1: Costrutto impiegato per l'espressione in pianta del gene *TnBVank1*; 35S:promotore CaM35S; myc: epitopo c-myc; nos ter della nopalina sintasi

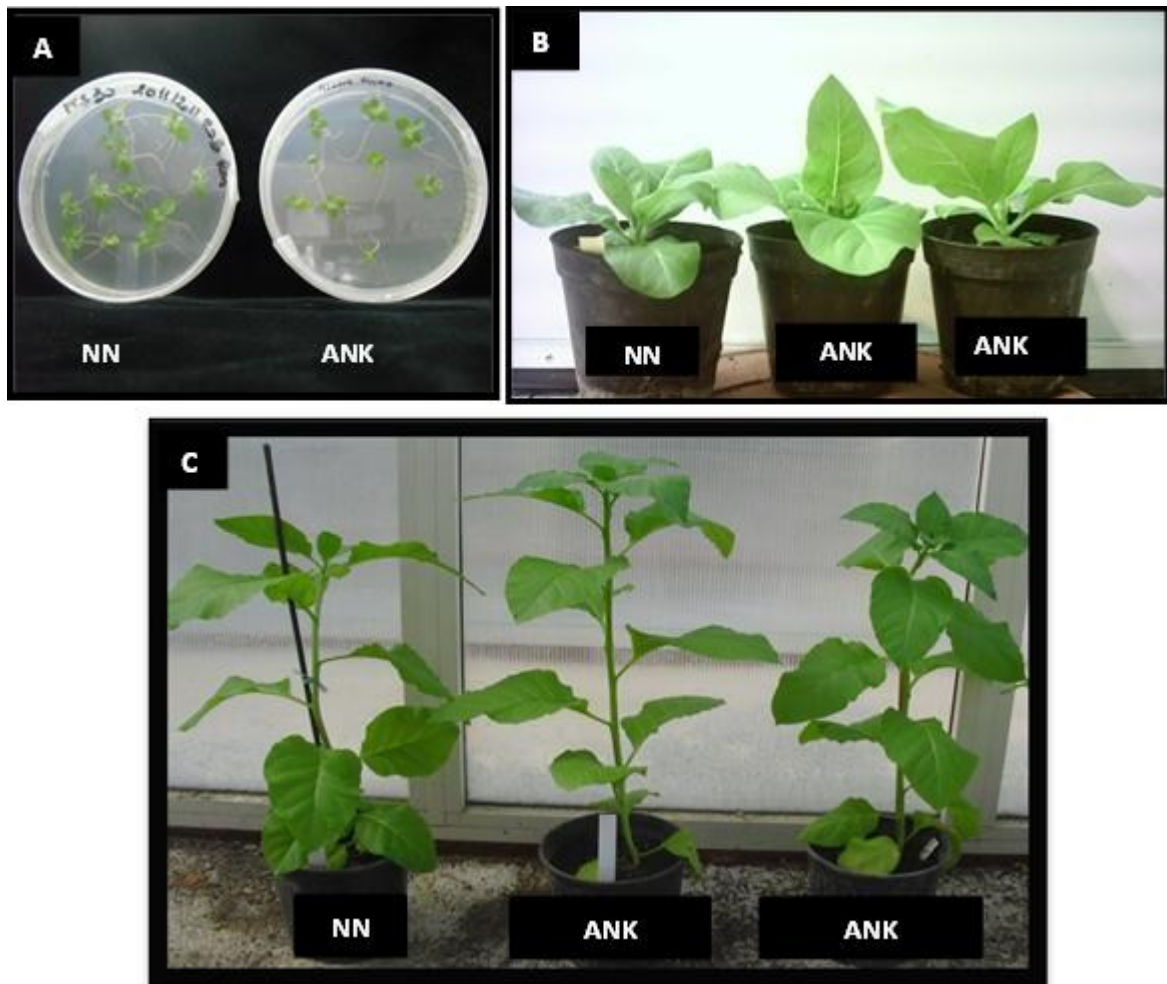


Fig.4.2: A)Selezione dei transgeni su mezzo selettivo contenente Kanamicina; B-C)Analisi fenotipica delle piante ANK

La selezione dei transgeni è stata effettuata mediante la germinazione dei semi su mezzo selettivo contenente kanamicina (Fig.4.2A), dove solo quei semi che presentano la cassetta di espressione integrata nel loro genoma risultano essere resistenti all'antibiotico e quindi a germinare. L'analisi fenotipica dei transgeni non ha rivelato differenze tra i trasformanti (ANK) e le piante controllo(*wild type* NN) (Fig. 4.2B e 4.2C)

4.1.1 Analisi trascrittomica di piante ANK

Lo studio trascrittomico di piante ANK e controllo NN, è stato effettuato mediante analisi microarray con piattaforma combimatrix. L'analisi è stata incentrata su quattro confronti:

1. Controllo (NN) elicitato su controllo, con lo scopo di verificare l'effetto dell'elicitore sul trascrittoma di tabacco e la sua capacità di attivare le risposte di difesa.
2. Transgenico su controllo, con lo scopo di determinare come il gene esogeno moduli il trascrittoma di tabacco
3. Transgenico elicitato su transgenico, per verificare l'effetto del transgene sul trascrittoma in seguito ad elicitazione
4. Transgenico e controllo entrambi elicitati per verificare nelle piante sia l'effetto del transgene che dell'elicitore.

4.1.1.1 Geni differenzialmente espressi in tabacco in seguito ad elicitazione con capsiceina (1)

Per valutare l'impatto della capsiceina sul trascrittoma di tabacco e verificare l'effettiva induzione della SAR, sono stati analizzati i geni modulati in piante di tabacco non trasformate in seguito a capitozzamento e trattamento con capsiceina, un noto elicitore di risposte fungine. L'analisi trascrittomica è stata effettuata mediante microarray su piattaforma combimatrix. Questa analisi ha evidenziato 113 geni differenzialmente espressi, di cui 31 sottoespressi e 82 sovraespressi. I geni sono stati annotati funzionalmente utilizzando il software "Blast2go" e per i geni per i quali non era disponibile un'annotazione funzionale automatica mediante il software, si è ricorso all'annotazione manuale facendo riferimento al sito www.geneontology.org. La distribuzione secondo la categoria ontologica "Biological Process" dei geni differenzialmente espressi annotati è mostrata in fig.4.3 (tabella A1 e A2) dove è possibile notare che tra i geni sovraespressi appartenenti alle risposte a stimoli (13% dei geni), circa 13 geni sono coinvolti direttamente nelle risposte di difesa a stress biotici come PR-1, PR-4, chitinasi e diverse classi di inibitori di proteasi, suggerendo che tale elicitore induce risposte regolate da diversi ormoni. Appartenenti alla classe degli inibitori di proteasi, vi sono gli inibitori di carbossipeptidasi che espressi soprattutto nelle *Solanacee* sono attive contro metallocarbossipeptidasi di animali e microrganismi (Havkioja and Neuvenon, 1985). Insieme agli inibitori di proteasi I e II si accumulano in tuberi di patata durante le

fasi di sviluppo, in patata e pomodoro è stato registrato un loro accumulo in foglia in seguito a ferita (Graham and Ryan, 1981; Hollander-Czytko *et al.* 1985; Díez-Díaz *et al.*, 2004) ed al trattamento con sistemina e metil-jasmonato (Díez-Díaz *et al.*, 2004).

La sovraespressione del gene *Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein169* (ACRE169), conferma il riconoscimento dell'elicitore fungino da parte della pianta. In pomodoro i geni *Cf* conferiscono resistenza nei confronti del fungo *Cladosporium fulvum*, in seguito al riconoscimento con il fattore di avirulenza *Avr*, con il successivo cambiamento nel flusso di ioni (Piedras *et al.*, 1998, Blatt *et al.*, 1999; Heese *et al.*, 2005), produzione di ROS (Piedras *et al.*, 1998) ed attivazione di chinasi (Romeis *et al.*, 1999, 2000, 2001), che provocano l'attivazione delle risposte di difesa. L'attivazione di queste risposte sono mediate dalle proteine ACRE che codificano per componenti del segnale cellulare giocano un ruolo centrale nell'induzione delle risposte di difesa. Tale sistema è stato identificato anche in tabacco, ed il silenziamento di tre geni ACRE tra cui una *Avr9/Cf-9 induced kinase1*, mediante la tecnica del *virus-induced gene silencing* (VIGS) ha compromesso l'attivazione della risposta HR (Rowland *et al.*, 2005). Alle risposte a stimoli inoltre, appartengono geni come *NADH deidrogenasi*, *ascorbato perossidasi*, *purple acid fosfatasi* e *citocrompo p450*, coinvolti nel burst ossidativo. Il gene *purple acid phosphatase* codifica per proteine ubiquitarie ed abbondanti in piante, animali, funghi e batteri che catalizzano l'idrolisi di un ampio range di P-monoesteri. Esso è implicato nella produzione, il trasporto di P_i , importanti per il metabolismo cellulare ed il processo energetico. La sua espressione in pianta è indotta da vari stress, come mancanza di acqua, salinità e deficienze nutrizionali. In *Arabidopsis* è stato identificato il suo coinvolgimento nel metabolismo dei ROS causato da infezioni patogene (Bozzo *et al.*, 2002; Kaida *et al.*, 2010).

Appartenente alla categoria trasduzione del segnale, vi sono le *leucine-rich repeat protein*. Tali proteine sono impegnate nell'interazione specifica proteina-proteina ed hanno un ruolo predominante nella difesa dove svolgono una duplice funzione, ovvero sono in grado di riconoscere gli elicitori dei patogeni e successivamente attivare una cascata di segnali che hanno come fine ultimo, la trascrizione dei geni di difesa (Jones and Jones, 1997; Padmanabhan *et al.*, 2009). La loro sovraespressione conferma che la pianta di tabacco, percepisce l'elicitore ed attiva le risposte di difesa.

Geni coinvolti nel rimodellamento della parete cellulare come glucanasi, pectin metilesterasi, sono inclusi nella classe dei processi metabolici (22%). Il numero di geni sottoespressi è risultato di gran lunga inferiore, ma tra questi vi è la catalasi, un enzima ubiquitario ed impegnato nel burst ossidativo, in particolare nella formazione di H_2O_2

(Mhamdhi *et al.*, 2010). La sottoespressione di tale gene è riportata in letteratura in piante di tabacco inoculate con il virus TMV. L'infezione virale riduce i livelli di trascritto di *NgCat1* codificante per una catalasi e che la modulazione di tale gene, sembra essere inversamente proporzionale all'accumulo di SA (Yi *et al.*, 2003).

Dai risultati ottenuti è possibile affermare che in seguito ad elicitazione con capsiceina, la sovraespressione di proteine ricche in leucina (LRR), impegnate nella trasduzione del segnale, e di molti geni appartenenti a stress biotici, confermano l'avvenuta induzione delle risposte di difesa.

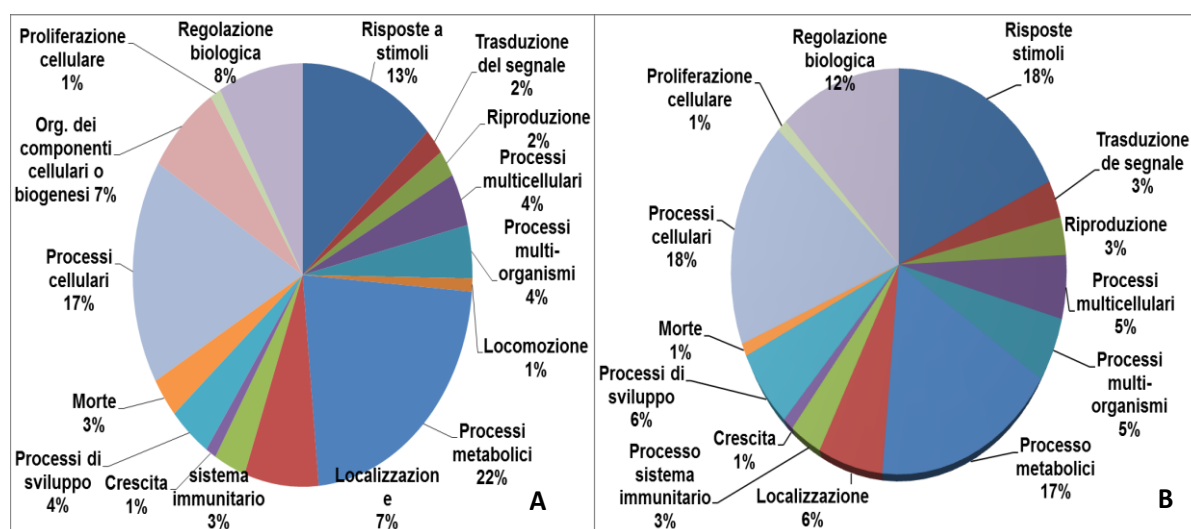


Fig. 4.3: Distribuzione funzionale secondo la categoria ontologica "Biological Process" dei geni up-regolati(A) e down-regolati (B) nel genotipo wild type in seguito a trattamento con capsiceina

Tabella A1: Geni overespressi con *Fold Change* superiore a 2 nelle piante controllo trattate con capsiceina; **AGI:** Gene Index Accession number; **TC:** Tentative consensus; **FC:** fold change

TC	FC	Geni
Risposte a stimoli		
TC129018	6,1	pathogenesis-related protein 1
TC122967	5,5	3)-beta-glucan endohydrolase short=(1-
TC168543	5,0	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 169
TC133680	4,7	trypsin proteinase inhibitor precursor
TC126488	4,6	nad h dehydrogenase 18
TC140905	4,5	rtm1
TC133685	3,7	cytochrome c-type biogenesis protein
TC133198	3,6	nac domain protein
TC128086	3,4	lsd1-like protein
TC145585	3,1	peptidase m16 family protein
TC136138	3,1	pathogenesis-related protein 4b
TC151964	3,0	2-oxoglutarate and fe -dependent oxygenase-like protein
TC152671	3,0	saur family protein
TC122985	2,8	class II chitinase
TC141243	2,7	patatin-like protein 3
TC135523	2,6	ascorbate peroxidase
TC155777	2,5	disease resistance protein-like
TC144182	2,3	acidic endochitinase-like
TC141034	2,3	ammonium transporter
TC146386	2,2	protease inhibitor II
TC123287	2,2	cytochrome p450
TC164799	2,2	plasma membrane intrinsic protein
TC131844	2,2	metallocarboxypeptidase inhibitor precursor
TC136419	2,1	purple acid phosphatase
TC123834	2,1	udp-glucose pyrophosphorylase
TC137567	2,1	probable nucleoredoxin 1-like
TC127472	2,0	kda class i heat shock protein
Trasduzione del segnale		
TC139400	2,9	leucine-rich repeat protein
Rirpoduzione		
TC137713	3,0	glycine-rich protein precursor

TC	FC	Geni
<i>Locomozione</i>		
TC127809	3,6	nonclathrin coat protein zeta2-cop
TC124555	2,2	clathrin light chain 2-like
<i>Processi metabolici</i>		
TC137930	3,9	glyoxalase i
TC125309	3,5	pectin methylesterase
TC123122	3,4	caffeic acid 3-o-methyltransferase
TC133911	3,4	proteasome maturation factor ump1 family protein
TC129910	3,1	epoxide hydrolase 2-like
TC132706	3,0	coatomer subunit beta -2-like
TC125907	2,7	probable beta- -galactosyltransferase 11-like
TC131325	2,6	endoglucanase 11-like
TC129828	2,3	udp-glycosyltransferase 91a1-like
TC146347	2,2	acetyl-coenzyme a synthetase
TC132915	2,2	ubiquitin-associated ts-n domain-containing protein
TC131094	2,1	aldose 1-epimerase family protein
TC165446	2,1	ribulose biphosphate carboxylase
TC136473	2,1	udp-sulfoquinovose synthase
<i>Sistema immunitario</i>		
TC124296	2,5	tumor-related protein
<i>Crescita</i>		
TC146200	2,0	regulatory-associated protein of tor 1-like
<i>Morte</i>		
TC128086	3,4	lsd1-like protein
<i>processi cellulari</i>		
TC149404	4,7	Auxin-binding protein T92;
TC130397	4,0	tpx2 (targeting protein for xklp2) protein family
TC126106	3,7	protein red-like
TC130743	3,1	xenotropic and polytropic murine leukemia virus receptor ids-
TC123081	2,8	light-harvesting complex ii protein lhcb3
TC130553	2,4	l-galactose-1-phosphate phosphatase
TC148395	2,2	pollen allergen ole e 6-like

TC	FC	Geni
<i>Org. dei componenti cellulari o biogenesi</i>		
TC135510	3,5	u6 snrna-associated sm-like protein lsm7
TC139157	3,5	mnd1-interacting protein 1-like
TC134137	2,0	histone h3
<i>Regolazione biologica</i>		
TC159192	4,7	integrase
TC128044	3,7	delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase
TC154759	3,3	ring finger
TC155129	3,2	nucleotidyl transferase domain-containing protein
TC126560	2,5	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
TC143015	2,4	copper chaperone
TC164465	2,1	light inducible tissue-specific st-ls1
TC131554	2,0	soluble diacylglycerol acyltransferase
<i>Non caratterizzate</i>		
TC163041	3,6	ND
TC136189	3,1	af439849_1 at2g31130
TC125737	2,9	---NA---
TC141276	2,6	protein
TC152711	2,6	cst complex subunit ten1-like isoform 1
TC142607	2,4	---NA---
TC128191	2,4	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100249657
TC162627	2,2	---NA---
TC164302	2,1	---NA---

Tabella A2: Geni down-regolati con *Fold Change* inferiore a 0,5 nelle piante controllo trattate con capsiceina; **AGI:** Gene Index Accession number; **TC:** Tentative consensus; **FC:** fold change

TC	FC	Geni
<i>Risposte a stimoli</i>		
TC143734	0,50	isochorismate synthase protein
TC127148	0,49	mlp-like protein 28
TC123457	0,49	senescence-associated protein
TC123382	0,45	bifunctional nuclease in basal defense response 1
TC133333	0,45	zf-hd homeobox protein at4g24660-like
TC146555	0,44	proline dehydrogenase
TC167469	0,44	amino acid binding
TC132319	0,43	like protein
TC152204	0,41	proteinase inhibitor i
TC162875	0,41	catalase
TC129774	0,38	aspartyl protease
TC130340	0,38	vacuolar iron transporter homolog 4-like
TC137902	0,31	chaperone protein dnaj chloroplastic-like
TC139448	0,17	Stem-specific protein TSJT1
TC126976	0,15	auxin-repressed protein
TC135081	0,08	auxin-repressed kda protein
<i>Rirpoduzione</i>		
TC142629	0,47	elongator complex protein 2-like
<i>Processi metabolici</i>		
TC124200	0,48	n-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
TC129246	0,45	l-ascorbate oxidase homolog
TC128563	0,18	beta-galactosidase precursor
<i>Processi di sviluppo</i>		
TC128134	0,50	cyclin d3-1
TC160752	0,49	at2g10940-like protein
TC131457	0,42	hmg-y-related protein a
TC138362	0,26	flowering-promoting factor 1-like protein 1-like
<i>Regolazione biologica</i>		
TC134506	0,22	14 kda proline-rich protein
TC123867	0,40	f-box family protein
<i>Non caratterizzate</i>		
TC129306	0,46	hydrogen peroxide-induced 1
TC146820	0,43	---NA---
TC160404	0,39	---NA---

4.1.1.2 Geni di tabacco modulati dal gene *TnBVank1* (2)

Per valutare l'effetto dell'inserzione del gene esogeno nel genoma di tabacco e osservare le ripercussioni di questo evento sul trascrittoma, sono stati confrontati i geni modulati nelle piante transgeniche rispetto al controllo. L'inserzione del transgene ha un moderato impatto sul trascrittoma di tabacco, in quanto l'analisi ha evidenziato 12 geni sovraespressi e 30 sottoespressi. La distribuzione dei geni è mostrata in fig.4.4 (Tabella A3 e A4). Tra i geni sottoespressi, appartenenti alla categoria delle risposte a stimoli di cui fanno parte il 14% dei geni, risultano essere rilevanti i regolatori trascrizionali come il *Golden2-like* (*glk1*) ed il *ssDNA binding protein*. L'attivatore trascrizionale *glk1* regola l'espressione di molti geni implicati nella risposta a stress biotici. La sua overespressione in *Arabidopsis*, incrementa la trascrizione di geni come PR10, idrolasi, peptidi antimicrobici ed altri geni associati alla risposta a patogeni (Savitch *et al.*, 2007).

I *ssDNA binding protein* sono regolatori che legano fattori di trascrizione in grado di riconoscere motivi TGAC presenti su promotori di geni impegnati nella difesa come le PR. In patata il legame del regolatore *PR-10a binding factor 2* (PBF2) che lega l'*elicitor response element* (ERE), attiva la trascrizione di PR10, promuovendo la resistenza a *Phytophthora* (Desveaux *et al.*, 2000). Tra i geni down-regolati ci sono anche geni coinvolti nelle risposte a stress biotico come PR-1, PR-4, ed inibitori di proteasi.

In questo confronto, il numero di geni sovraespressi è risultato di gran lunga inferiore, ma tra questi, la up-regolazione di proteine impegnate nella trasduzione del segnale come le *leucine-rich repeat protein* (LRR), indicano una probabile attivazione di alcune risposte di difesa, mentre la variazione dello stato ossidativo cellulare, registrata dalla sovraespressione della superossido dismutasi suggerisce che la pianta transgenica è in un moderato stato di stress; infatti in caso di stress quando nella cellula incrementano i livelli di O_2^- , esso causa la dismutazione dell'anione a H_2O_2 (Alsher *et al.*, 2002).

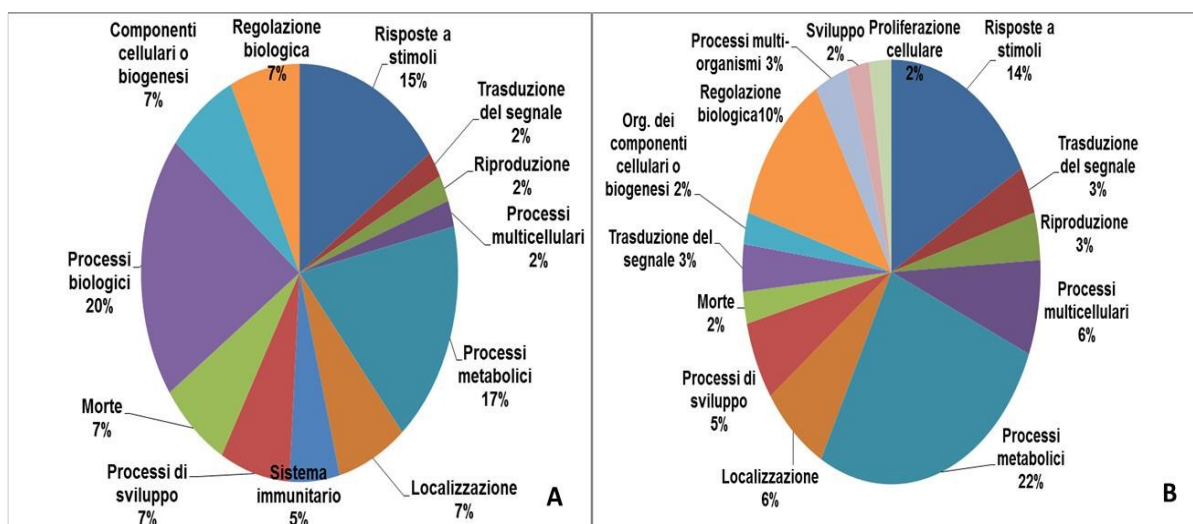


Fig. 4.4: Distribuzione funzionale secondo la categoria ontologica “Biological Process” dei geni up-regolati (A) e down-regolati (B) nel genotipo ANK

Tabella A3: Geni overespressi con *Fold Change* superiore a 2 nelle piante ANK; **AGI:** Gene Index Accession number; **TC:** Tentative consensus; **FC:** fold change

TC	FC	Geni
<i>Risposte a stimoli</i>		
TC122967	3,42	3)-beta-glucan endohydrolase short=(1-
TC135414	2,08	superoxide dismutase
TC136309	2,05	xyloglucan endotransglucosylase hydrolase
TC141516	2,09	cysteine proteinase
<i>Processi metabolici</i>		
TC123808	2,29	lecithine-cholesterol acyltransferase-like 4-like
<i>Trasduzione del segnale</i>		
TC139400	2,02	leucine-rich repeat protein
<i>Org. dei componenti cellulari o biogenesi</i>		
TC161292	2,74	dag protein
TC127656	2,72	delta tonoplast intrinsic protein
<i>Regolazione biologica</i>		
TC143015	3,30	copper chaperone
TC126115	2,05	early nodulin-like protein
<i>Non caratterizzate</i>		
TC123962	2,06	unnamed protein product
TC142607	2,00	---NA---

Tabella A4: Geni down-regolati con *Fold Change* inferiore a 0.5 nelle piante ANK;
AGI: Gene Index Accession number; **TC:** Tentative consensus; **FC:** fold change

TC	FC	Geni
Risposte a stimoli		
TC158190	0,48	metallocarboxypeptidase inhibitor
TC146532	0,48	transcription activator glk1-like
TC136483	0,48	ssdna-binding transcriptional regulator
TC135713	0,47	class ii small heat shock protein le-
TC163670	0,46	NT6, partial
TC131895	0,43	ammonium transporter
TC131122	0,43	calreticulin
TC136685	0,43	alcohol dehydrogenase
TC145668	0,41	pathogenesis-related protein 1
TC146555	0,37	proline dehydrogenase
TC144015	0,31	cytochrome p450 like_tbp
TC135081	0,28	auxin-repressed kda protein
Rirpoduzione		
TC146532	0,48	transcription activator glk1-like
TC139206	0,46	CCAAT-binding transcription factor subunit B
TC144554	0,49	beta-keto-ACP reductase
Processi multicellulari		
TC159967	0,48	chaperone binding atpase activator
Processi metabolici		
TC122886	0,49	hexokinase
TC133454	0,48	lipid phosphate phosphatase 3
TC139859	0,48	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-related protein
TC139835	0,48	hiv tat-specific factor 1 homolog
TC150883	0,46	Benzyl alcohol O-benzoyltransferase
TC158533	0,46	inorganic pyrophosphatase
TC132229	0,42	fatty oxidation complex alpha subunit
TC128563	0,39	beta-galactosidase precursor
Localizzazione		
TC143200	0,49	olee1-like
Org. dei componenti cellulari o biogenesi		
TC146532	0,48	transcription activator glk1-like

TC	FC	Geni
<i>Regolazione biologica</i>		
TC130381	0,47	vacuolar protein sorting
<i>Proliferazione cellulare</i>		
TC153693	0,48	A-type cyclin
TC161663	0,46	atp binding
<i>Non caratterizzate</i>		
TC151039	0,49	---NA---
TC165815	0,47	---NA---

4.1.1.3 Geni di tabacco modulati dal gene *TnBVank1* in seguito ad elicitazione con capsiceina (3)

Con lo scopo di monitorare l'effetto del transgene a seguito di induzione delle risposte di difesa, è stata valutata la modulazione dei profili di espressione di geni di difesa nei genotipi transgenici ank trattati con capsiceina. L'analisi ha rivelato un totale di 91 geni modulati di cui 58 sovraespressi e 33 sottoespressi. Le principali categorie funzionali in cui vengono a distribuirsi i geni up-regolati sono "risposte a stimoli" e "processi metabolici". Nella prima categoria, vi sono geni coinvolti nella difesa a stress biotici come le PR-1, PR-4, varie classi di inibitori di proteasi e il 4-cumarato ligasi. Quest'ultimo codifica per un enzima chiave del pathway dei fenilpropanoidi, che è responsabile della produzione di numerosi composti ad attività antimicrobica ed antifungina, nonché di precursori della parete cellulare (Naoumkina *et al.*, 2010). L'analisi ha inoltre rivelato l'attivazione di altri geni di risposta come la *wound induced protein2* prodotta in pianta in seguito a vari stimoli come l'attacco di funghi patogeni o insetti fitofagi (Ponstein *et al.*, 1994).

Tra i geni down-regolati, la perossidasi e la DNAj appartenente a risposte a stimoli, risultano svolgere un ruolo nelle risposte di difesa contro stress biotici. Le DNAJ, appartenenti alla famiglia delle *heat shock protein*, sono chaperoni molecolari. Tali proteine in assenza di stress sono impiegate nel folding, assemblamento, disassemblamento e veicolamento negli organelli delle proteine neosintetizzate ed in condizioni di stress svolgono un ruolo nella protezione delle stesse dalla degradazione e dalla formazione di un errato assemblamento (Linke *et al.*, 2003). La sottoespressione di questi geni in seguito ad elicitazione, conferma la capacità inibitoria di *TnBVank1* nei confronti di alcuni geni; mentre i geni sovraespressi invece, sono riconducibili alle risposte di difesa mediate da i due principali ormoni, acido salicilico (SA) e acido jasmonico (JA). La distribuzione funzionale dei geni up e down-regolati è mostrata in figura 4.5 e in tabella A5 e A6.

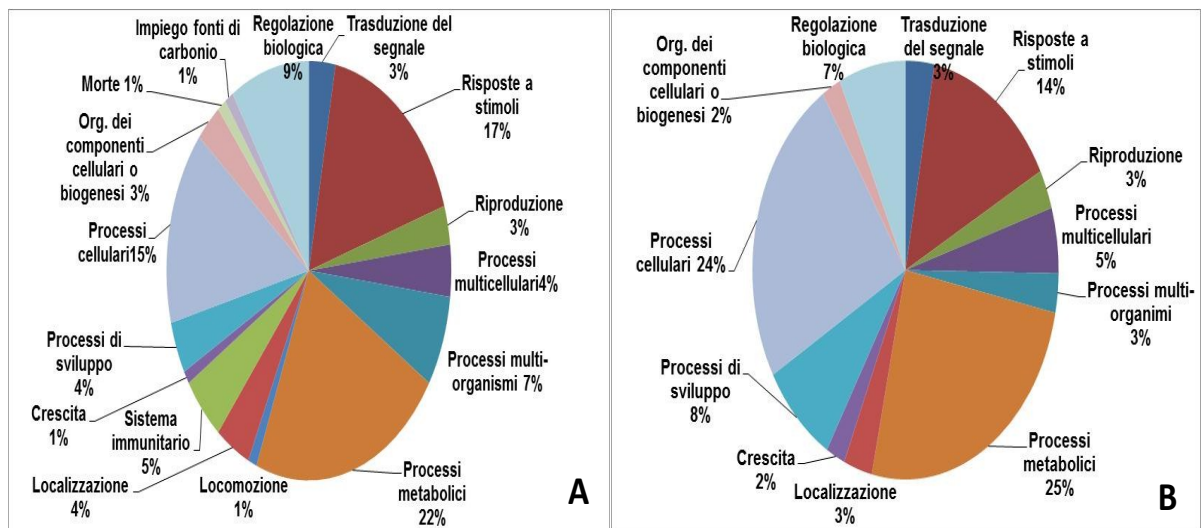


Fig. 4.5: Distribuzione funzionale secondo la categoria ontologica “Biological Process” dei geni up-regolati (A) e down-regolati (B) nel genotipo ANK elicitato con capsiceina e genotipo ANK

Tabella A5: Geni overespressi con *Fold Change* superiore a 2 nelle piante ANK trattate con capsiceina; **AGI:** Gene Index Accession number; **TC:** Tentative consensus; **FC:** fold change

TC	FC	Geni
<i>Trasduzione del segnale</i>		
TC139400	2,62	leucine-rich repeat protein
<i>Risposte a stimoli</i>		
TC129018	23,20	Pathogenesis-related protein 1
TC145668	11,20	pathogenesis-related protein 1A precursor
TC132620	5,90	extensin-like protein
TC124941	4,50	kunitz-like protease partial
TC165452	4,02	trypsin proteinase inhibitor precursor
TC131341	3,60	metallocarboxypeptidase inhibitor precursor
TC136138	3,60	pathogenesis-related protein 4b
TC147774	3,26	nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase
TC164344	3,10	wound-induced protein win2
TC123149	2,98	osmotin-like protein
TC130743	2,84	xenotropic and polytropic murine leukemia virus receptor ids-
TC141034	2,80	ammonium transporter
TC149436	2,80	nimin2b protein
TC122967	2,72	3)-beta-glucan endohydrolase short=(1-
TC137567	2,68	probable nucleoredoxin 1-like
TC160005	2,54	phosphoglycerate mutase family protein
TC131122	2,50	calreticulin
TC167166	2,34	mitochondrial chaperone bcs1
TC125899	2,26	4-coumarate:coenzyme a ligase
TC144015	2,17	cytochrome p450 like_tbp
TC123287	2,16	cytochrome p450
TC128225	2,14	starch synthase iib precursor
TC122995	2,12	class ii chitinase
TC122999	2,10	beta- -glucanase
TC133693	2,09	polyphenol oxidase
TC129533	2,06	ferrochelataste- chloroplastic-like
TC122985	2,04	class ii chitinase
TC155281	2,04	thionin-like protein
TC144182	2,03	acidic endochitinase-like

TC	FC	Geni
<i>Rirpoduzione</i>		
TC134453	2,59	glutaredoxin
TC142445	2,19	basic blue
<i>Processi metabolici</i>		
TC123396	3,03	ornithine decarboxylase
TC123645	2,35	3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase
TC132541	2,33	alpha- glucan phosphorylase I chloroplastic amyloplastic-like
TC123730	2,30	cystathionine gamma-synthase
TC129308	2,29	epoxide hydrolase
TC126632	2,10	pseudouridine-5 -monophosphatase-like
TC126840	2,06	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
TC132468	2,04	glucosyl transferase
TC127777	2,03	cyclophilin
TC145934	2,01	plastidic aldolase
<i>Sistema immunitario</i>		
TC132784	2,48	enhanced disease susceptibility 1
<i>Processi cellulari</i>		
TC127316	4,42	atp binding
TC122855	2,63	phosphate transporter
<i>Regolazione biologica</i>		
TC126478	2,17	auxin:hydrogen
TC124057	2,17	nuclear transcription factor y subunit a-10-like
TC126632	2,10	pseudouridine-5 -monophosphatase-like
TC166577	2,10	23s ribosomal rna
TC150893	2,09	pg1 homology to homo sapiens
<i>Non caratterizzate</i>		
TC161183	6,70	---NA---
TC158664	2,33	---NA---
TC143852	2,30	---NA---
TC138263	2,22	protein
TC123374	2,17	---NA---
TC139814	2,15	---NA---
TC134123	2,05	protein

Tabella A6: Geni downregolati con *Fold Change* inferiore a 0.5 nelle piante ANK trattate con capsiceina; **AGI:** Gene Index Accession number; **TC:** Tentative consensus; **FC:** fold change

TC	FC	Geni
<i>Risposte a stimoli</i>		
TC141046	0,46	maternal effect embryo arrest 14 protein
TC129369	0,41	peroxidase 53
TC123457	0,49	senescence-associated protein
TC128474	0,49	mlp-like protein 423
TC166795	0,45	cysteine proteinase
TC135163	0,29	senescence-associated protein
TC137902	0,48	chaperone protein dnaj chloroplastic-like
TC136309	0,45	xyloglucan endotransglucosylase hydrolase
<i>Rirpoduzione</i>		
TC138362	0,41	flowering-promoting factor 1-like protein 1-like
<i>Processi metabolici</i>		
TC128563	0,44	beta-galactosidase precursor
TC133779	0,42	beta-galactosidase
TC123095	0,48	o-acyltransferase wsd1
TC126521	0,46	serine carboxypeptidase ii-3
TC136722	0,46	invertase inhibitor
TC125566	0,36	isoflavone reductase homolog
<i>Processi cellulari</i>		
TC149163	0,48	nitrate transporter -like
TC124784	0,42	fasciclin-like arabinogalactan protein 9
TC135081	0,30	auxin-repressed kda protein
TC151815	0,35	bet1-like snare 1-2-like
TC139918	0,48	e3 ubiquitin-protein ligase atl23-like
<i>Org. dei componenti cellulari o biogenesi</i>		
TC127506	0,48	cinnamoyl- reductase
<i>Regolazione biologica</i>		
TC143606	0,46	ribosomal protein l2
TC131457	0,48	hmg-y-related protein a
TC126115	0,37	early nodulin-like protein

TC	FC	Geni
Non caratterizzate		
TC160404	0,38 ---NA---	
TC155133	0,40 ---NA---	
TC128600	0,42 ---NA---	
TC132971	0,45 ---NA---	
TC136478	0,39 ---NA---	
TC145033	0,47 ---NA---	
TC160764	0,33 ---NA---	
TC126869	0,44 ---NA---	
TC139448	0,44 protein	

4.1.1.4 Effetto del gene *TnBVank1* sul trascrittoma di tabacco in seguito ad elicitazione con capsiceina (4)

Lo studio dei geni differenzialmente espressi nei genotipi transgenici trattati con capsiceina rispetto al controllo posto nelle stesse condizioni è stato effettuato per verificare la modulazione dei geni di difesa sotto l'influenza contemporanea del transgene e di un elicitore della SAR. L'analisi ha evidenziato la regolazione di 82 geni differenzialmente espressi di cui 16 sovraespressi e 66 sottoespressi.

L'annotazione funzionale ha mostrato che i geni sovraespressi, sono inclusi principalmente nella categoria "risposta a stimoli". In condizioni di elicitazione il gene *TnBVank1* induce geni quali risposte di difesa come le PR-1A, PR-4, osmotina, glucanasi ed inibitori di proteasi. La sovraespressione di questi geni attivi contro stress biotici, fa ipotizzare una possibile attività delle piante transgeniche contro insetti fitofagi. La distribuzione funzionale dei geni up-regolati e down-regolati è mostrata in figura 4.6 (A e B) e in tabella A7 e A8 (in appendice).

Geni coinvolti nelle risposte di difesa, sono presenti anche tra i geni down-regolati come il *Restricted Tobacco etch virus Movement* (RTM1), attivo nella resistenza contro i virus (Cosson *et al.*, 2012). Appartenenti a questa categoria vi è l'*abscisic acid receptor pyl4*, tale proteina appartiene alla famiglia delle PYR/PYL/RCAR *protein* ed agisce come recettore dell'acido abscissico (ABA). Esso coopera nel crosstalk tra diversi pathway regolati da vari ormoni come tra JA e ABA regolando la sintesi degli alcaloidi (Lackman *et al.*, 2011). Regolato dal MeJA esso può essere sovraespresso o sottoespresso a seconda del tessuto dove risiede (Gossens *et al.*, 2003). Un ulteriore gene regolato dall'ABA, risultato sovraespresso è il *Wrky10*. I geni appartenenti a questa famiglia sono regolatori chiave di molti processi cellulari relativi a stress biotici, abiotici, dormienza del seme e germinazione (Rushton *et al.*, 2010).

Tra i down-regolati sono presenti alcuni geni che codificano per le *late-embryogenesis-protein*, attivati nella cellula in caso di stress idrico. Tali geni possono essere espressi in differenti stadi dello sviluppo delle piante, come ad esempio l'embriogenesi. Accumulate nel citoplasma e nei plastidi, insieme alle *heat shock-protein* svolgono un ruolo di protezione di enzimi e lipidi in seguito a stress (Shinozaki and Yamaguchi 2000; Seki *et al.* 2002; Singh *et al.*, 2005).

Facenti parte delle “risposte a stimoli” vi sono geni coinvolti nella regolazione dello stress ossidativo come la *purple acid fosfatasi* e *NADH-deidrogenasi*. Infine, risultano sottoespressi geni appartenenti a processi metabolici che regolano la biosintesi della parete cellulare come pectinmetilesterasi e cellulasi e la biosintesi della lignina come caffeato-o-methyltrasferasi.

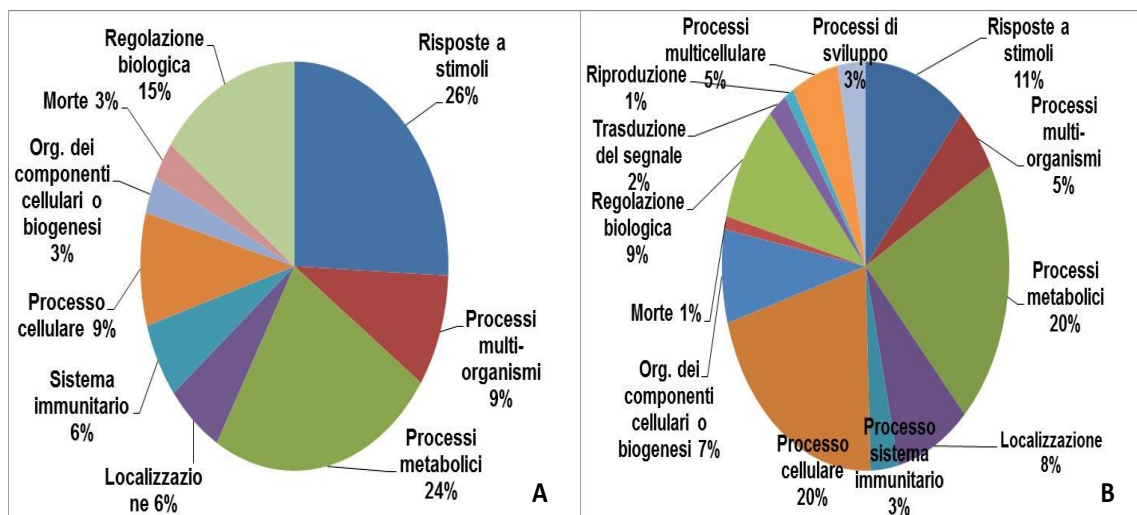


Fig. 4.6: Distribuzione funzionale secondo la categoria ontologica “Biological Process” dei geni up - regolati(A) e down-regolati (B) nel genotipi ANK e controllo, trattati con capsiceina

4.1.3 Effetto delle larve di *Spodoptera littoralis* sull'espressione del gene *PinII* nelle piante ANK1 e ANK4

La capacità del transgene di attivare in pianta alcune risposte di difesa in seguito ad elicitazione, in particolar modo geni appartenenti a diverse classi di inibitori di proteasi, ha fatto ipotizzare che le piante transgeniche potessero mostrare tolleranza verso larve di lepidotteri, insetti masticatori il cui accrescimento è noto essere ostacolato dagli inibitori di proteasi. Per verificare questa ipotesi è stata condotta un'analisi di espressione del gene *PinII*, un gene attivato in seguito a ferita meccanica o danno provocato da insetti masticatori (Koiwa *et al.*, 1997). L'analisi di espressione è stata condotta su piante controllo e due genotipi transgenici ANK1 e ANK4, le cui foglie erano state infestate da larve di *S.littoralis*. È stata valutata la quantità di trascritto di *PinII* sia sulle foglie attaccate che su quelle distali alla regione di attacco. L'analisi del gene *PinII* in assenza di danno è stata effettuata per valutare come il transgene influenzi il gene in esame (Fig.4.7). Il gene risulta essere significativamente sottoespresso nel genotipo ANK1, mentre la sua espressione non è influenzata nel genotipo ANK4.

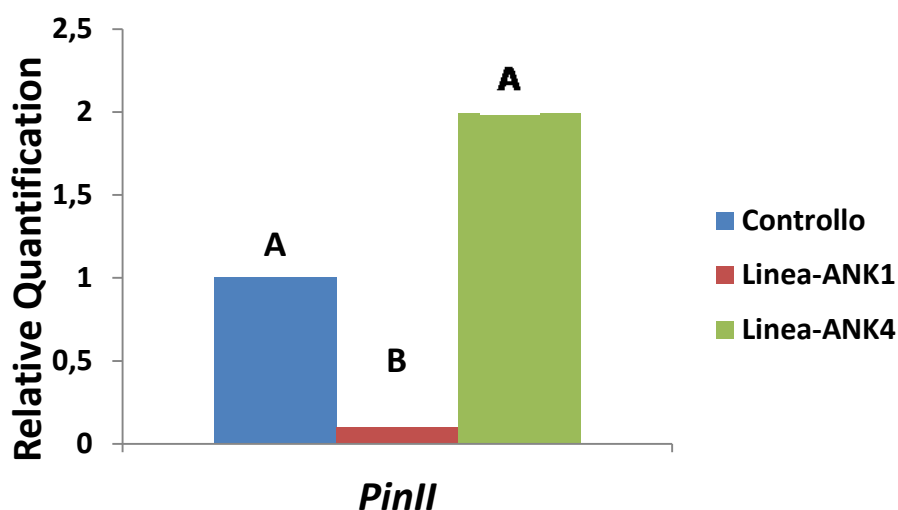


Fig. 4.7: Quantificazione relativa del gene *PinII*. Il grafico mostra i valori RQ relativi al calibratore Controllo dei diversi campioni Controllo e ANK (Linea-ANK1 e Linea-ANK4)

La figura 4.8A mostra l'analisi del gene *PinII* in foglie masticate da *S. littoralis* rispetto al Controllo (pianta *Wild type* non trattato). La masticazione induce già dopo 4 ore questo gene in tabacco (RQ=2.5 per controllo indotto, RQ=5.4 per ANK1 e RQ=12.7 per ANK4). Dopo 8 e 24 ore dal danno i livelli di RQ incrementano ulteriormente in tutti i genotipi. Nei genotipi transgenici infatti l'induzione del gene *PinII* segue lo stesso andamento che si

osserva sulle piante non trasformate, ma con dei livelli di RQ molto più alti (RQ=30 per controllo indotto; RQ= 80 ANK1 e RQ=90 ANK4 a 24 ore dall'induzione), facendo ipotizzare un effetto del *TnBVank1* sull'attivazione della trascrizione del gene.

L'attivazione del gene *PinII* è stata osservata anche nelle foglie distali (Fig.4.8B). Sebbene l'attivazione del gene è quantitativamente inferiore rispetto alle foglie locali, il gene è attivato distalmente già dopo 4 ore in tutti i genotipi analizzati, e rivela livelli di trascritto maggiori rispetto al controllo trattato. Le due linee transgeniche si differenziano sulla tempistica di induzione, in quanto nelle piante ANK4 l'attivazione del gene è precoce rispetto al genotipo ANK1. I dati ottenuti da questo esperimento suggeriscono complessivamente che il gene *TnBVank1* è coinvolto nell'amplificazione della trascrizione del gene *PinII* nelle piante attaccate da *Spodoptera* sia a livello locale che distale.

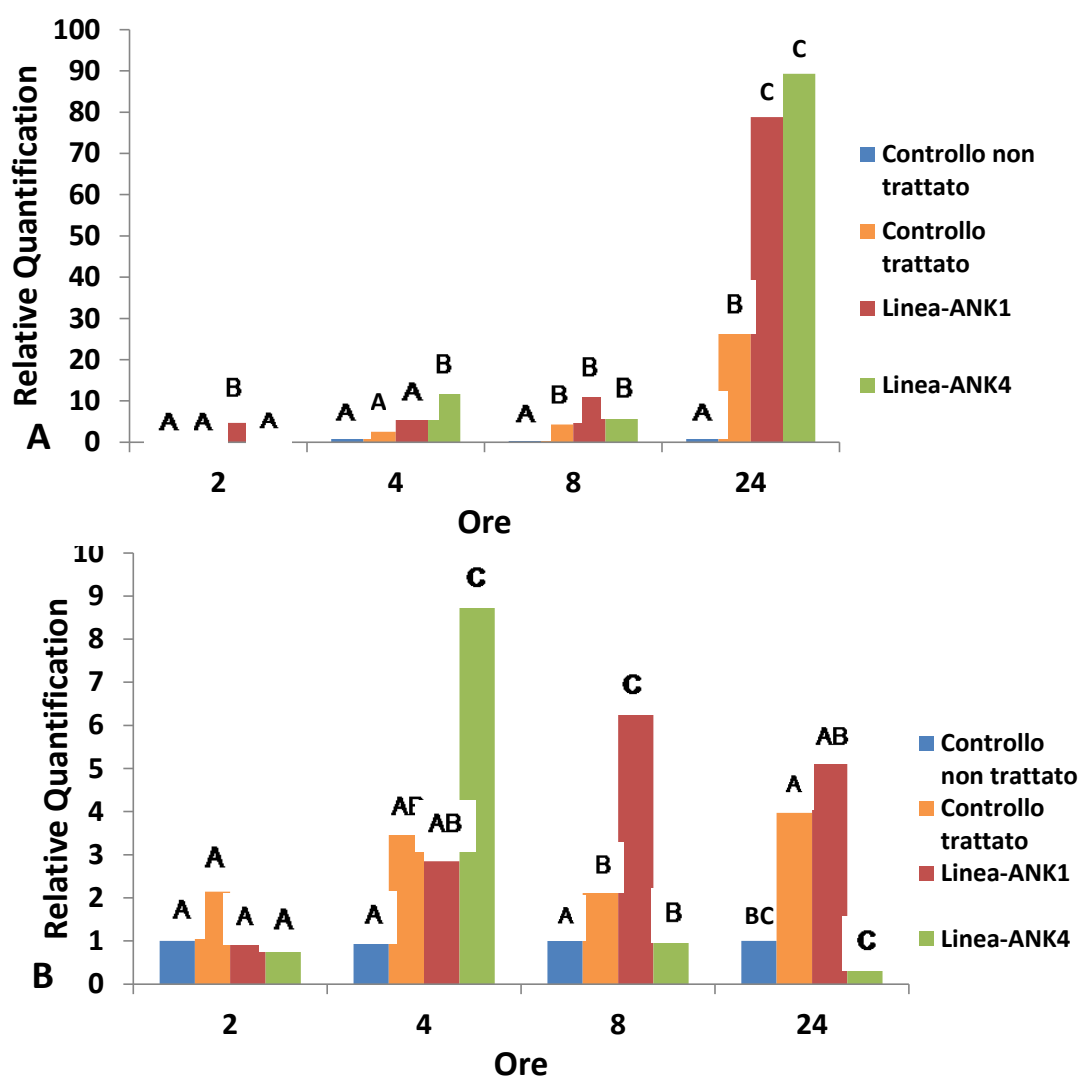


Fig.4.8 A e B: Quantificazione relativa del gene *Pin II* in seguito ad attacco con *S. littoralis*. Il grafico mostra i valori RQ relativi al calibratore Controllo non trattato dei diversi campioni Controllo trattato e piante ANK (Linea-ANK). A) foglia attaccata da larva; B) foglie distali dalla regione di attacco

4.1.3 Saggio biologico con *Spodoptera littoralis*.

Con l'obiettivo di valutare l'effetto del transgene e dei geni da essi modulati sullo sviluppo larvale, sono stati allestiti biosaggi di resistenza a *S.littoralis* in collaborazione con i docenti di entomologia del dipartimento. Larve di *Spodoptera* sono state alimentate su dischi fogliari di piante appartenenti a genotipi *wild type* e ANK1 e ANK4 registrando a giorni alterni il tasso di sopravvivenza. I risultati ottenuti sono stati elaborati mediante il test statistico LogRank. Come mostrato in figura 4.9, le larve alimentate sui genotipi transgenici presentano una minore sopravvivenza già dopo 10 giorni di allevamento; le differenze sulle piante transgeniche si protraggono fino al termine del saggio, dove le larve alimentate su controlli presentano una percentuale di sopravvivenza pari al 65%, mentre quelle relative a larve alimentate sui transgenici sono 10% e 22% rispettivamente per ANK1 e ANK4.

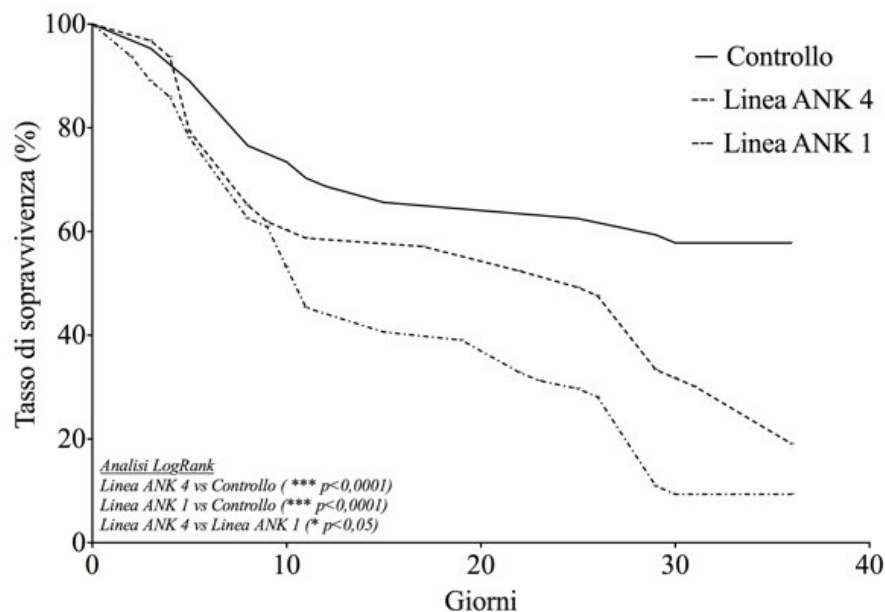


Fig. 4.9: Curva del tasso di sopravvivenza delle larve allevate sui genotipi transgenici (ANK1: Linea-ANK1 e ANK4: Linea-ANK4) e *wild type* (Controllo). Sull'asse x sono indicati i giorni, sull'asse delle y il tasso di sopravvivenza espresso in percentuali.

4.1.4 Caratterizzazione molecolare: quantificazione del livello di trascritto in pianta.

Allo scopo di identificare le basi molecolari relative alle differenti risposte osservate nei due genotipi transgenici sottoposti a saggi di induzione e di mortalità contro *S.littoralis* è stata allestita una quantificazione del livello del trascritto *TnBVank1* nelle piante transgeniche mediante analisi Real-Time RT-PCR assoluta.

4.1.4.1 Quantificazione assoluta del gene *TnBVank1*

L'RNA totale è stato isolato da foglie di piante ANK1 e 4, mediante analisi spettrofotometrica ed elettroforetica valutandone la quantità e qualità. Il rapporto A_{260}/A_{280} è risultato per tutti i campioni compreso tra 1.7 e 2.0. I campioni di RNA hanno presentato bande nette corrispondenti agli RNA ribosomiali come è possibile osservare in figura 4.10.

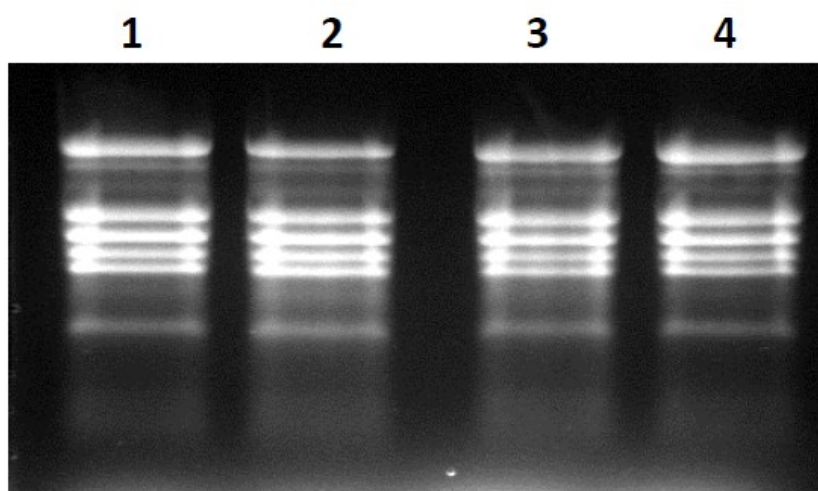


Fig.4.10: Valutazione della qualità dell'RNA estratto da piante ANK, mediante visualizzazione su gel di agarosio. Lane 1-2: piante ANK1 1; Lane 3-4: piante ANK4

L'RNA estratto di cui sono state verificate sia integrità che qualità è stato poi sottoposto a trattamento con DNAsi per eliminare eventuali contaminazioni di DNA genomico ed è stato successivamente adoperato per la sintesi di cDNA. L'avvenuta sintesi è stata verificata mediante amplificazione del gene *housekeeping EF1 α* , con primer che appaiono su due esoni consecutivi del gene *Ef1- α* espresso costitutivamente in tutti i tessuti vegetali (Pokalsky *et al.*, 1989). Questi primer permettono di discriminare il DNA dal cDNA, in quanto l'assenza di introni nel cDNA produce un amplicone di 687 bp, mentre sul DNA genomico la presenza dell'introne determina un'amplificazione di 767 bp. Le dimensioni

attese dell'amplificato e l'assenza di ulteriori bande di peso molecolare più elevato, dimostrano l'assenza di contaminazioni di DNA genomico (Fig.4.11).

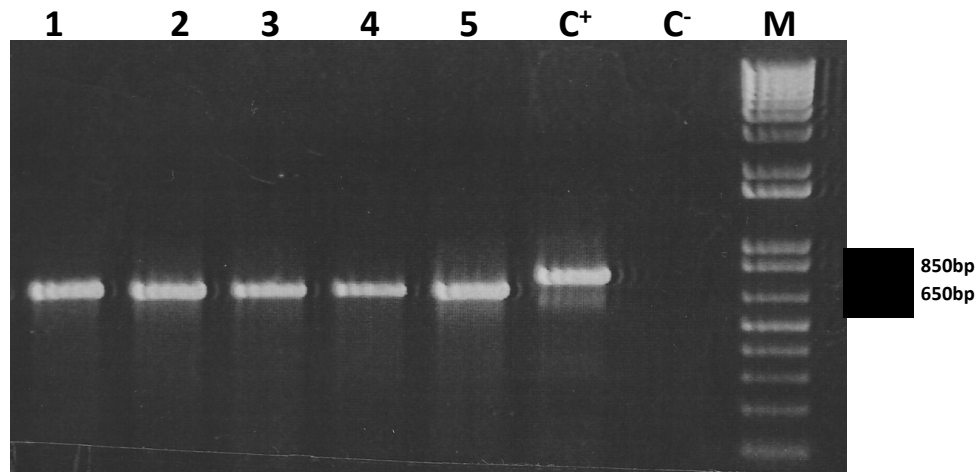


Fig.4.11 : Amplificazione PCR del gene *EF1α* di piante transgeniche su gel di agarosio . Lane1-2: campioni ANK1; Lane 3-5: campioni ANK4 Lane 6:C⁺: DNA genomico di *Nicotiana*; Lane7: C⁻: negativo contaminazioni; Lane8: marker 1 kb-plus DNA ladder (Invitrogen);

La retta di taratura per la quantificazione assoluta è stata ottenuta da quantità note del plasmide **pDE::Sp-ank-myc** (Fig.3.2). Esso presenta una cassetta di espressione contenente una sequenza di cDNA codificante per il gene virale *TnBvank1* inserito mediante elettroporazione in *E.Coli*. I plasmidi estratti sono stati sottoposti a quantificazione mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio. La stima della concentrazione è stata effettuata mediante confronto visivo dell'intensità della banda del plasmide con quella del DNA del fago λ . La figura 4.12A mostra la corsa elettroforetica del plasmide pAnk7. Come osservato nell'immagine, il plasmide estratto è integro e presenta una concentrazione che è stata stimata nell'intorno dei 500 ng/ μ l.

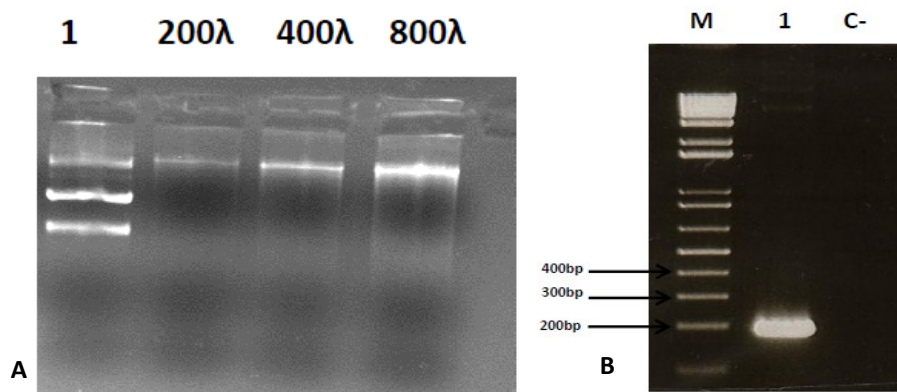


Fig. 4.12 A-B:A) Quantificazione DNA plasmidico mediante elettroforesi su gel di agarosio. Lane 1: Plasmide pAnk7; lane 2-4: DNA del fago λ (Promega) rispettivamente 200 ng, 400 ng, 800ng; B) Visualizzazione su gel dei prodotti di amplificazione del gene *TnBvank1* mediante elettroforesi su gel di agarosio. Lane1: Marker1 Kb Plus Ladder (Invitrogen); Lane 2: Plasmide pAnk7; Lane3: C- controllo contaminazioni.

La presenza del gene d'interesse è stata verificata mediante analisi PCR utilizzando primer specifici per il gene che, come mostrato in figura 4.12B, amplificano un frammento di circa 200 bp.

E' stata costruita una retta di taratura utilizzando quantità note del plasmide pDE::Sp-ank-myc. Per l'ottenimento della retta, a concentrazioni note del plasmide pDE::Sp-ank-myc, espresse in Log10 di molecole di DNA, sono state fatte corrispondere sull'asse delle ordinate i relativi cicli soglia (C_t). La retta di taratura, caratterizzata dall'equazione: $y = -3,0257x + 40,77$ e un R^2 pari a 0,99 (Fig.4.13A) ha permesso l'interpolazione dei C_t dei campioni in esame e dunque il calcolo del numero di molecole di trascritto (Dorak, 2006). Come mostrato in figura 4.13B le due linee transgeniche presentano quantità diverse di trascritto, infatti la ANK1 presenta $15 \cdot 10^7$ numero di molecole mentre la ANK4 $2,5 \cdot 10^7$. Tali differenze risultate statisticamente significative dall'analisi del T-test, non sembrano essere correlate al tasso di sopravvivenza osservato nel saggio biologico con *S.littoralis* per le due linee ANK1 e ANK4.

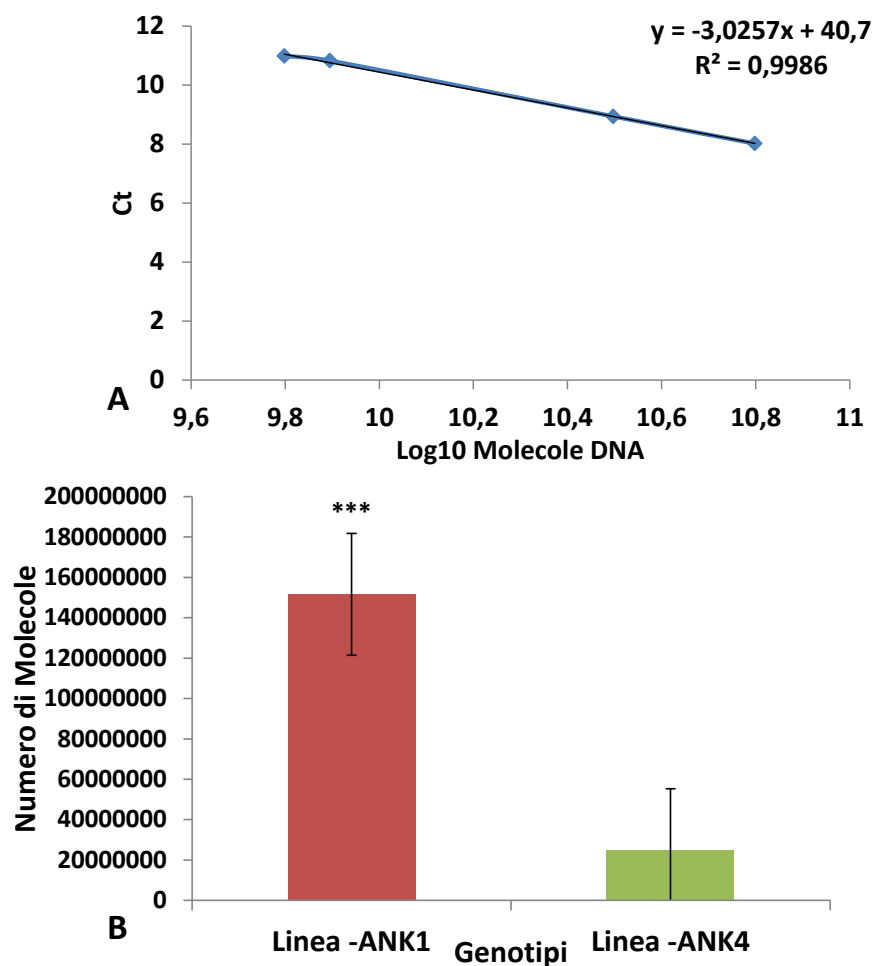


Fig.4.13: Quantificazione dei livelli di trascritto dei genotipi Linea-ANK mediante Real-Time RT-PCR assoluta; (A) Retta di taratura; (B) Quantificazione dei livelli di trascritto nelle piante ANK1: Linea-ANK1 e ANK4: Linea-ANK4.

4.2 PARTE II: Le piante transgeniche di pomodoro per il gene *Htr1* di *Trichoderma hartianum*

Piante di pomodoro della cv “Red Setter” sono state trasformate con il gene *Htr1* di *Trichoderma hartianum* sotto il controllo di un promotore inducibile.

Il cDNA (213 bp) è stato ingegnerizzato sotto il controllo di un promotore inducibile da etanolo (Syngenta), sfruttando un sistema naturale appartenente al fungo *Aspergillus nidulans* (Gatz et Lenk 1998) (Fig.4.14). Il sistema prevede due unità trascrizionali: la prima, sotto il controllo del promotore costitutivo CaMV 35S (virus del Mosaico del Cavolfiore) (Guilley *et al.*, 1982), che attiva la trascrizione del fattore trascrizionale *AlcR*; la seconda, invece, sotto il controllo del promotore *AlcA* che codifica per un alcol deidrogenasi (ADHI), contenente una piccola frazione del promotore 35S ed il gene di interesse. In assenza di etanolo, il fattore trascrizionale *AlcR* è incapace di legarsi al promotore *AlcA*, inibendo di conseguenza la trascrizione del gene di interesse. La presenza di etanolo nel mezzo permette la formazione di un complesso *AlcR*-etanolo provocando una modifica conformazionale del fattore *AlcR* che lo rende capace di legare il promotore *AlcA* e di indurre l'espressione del gene di interesse.

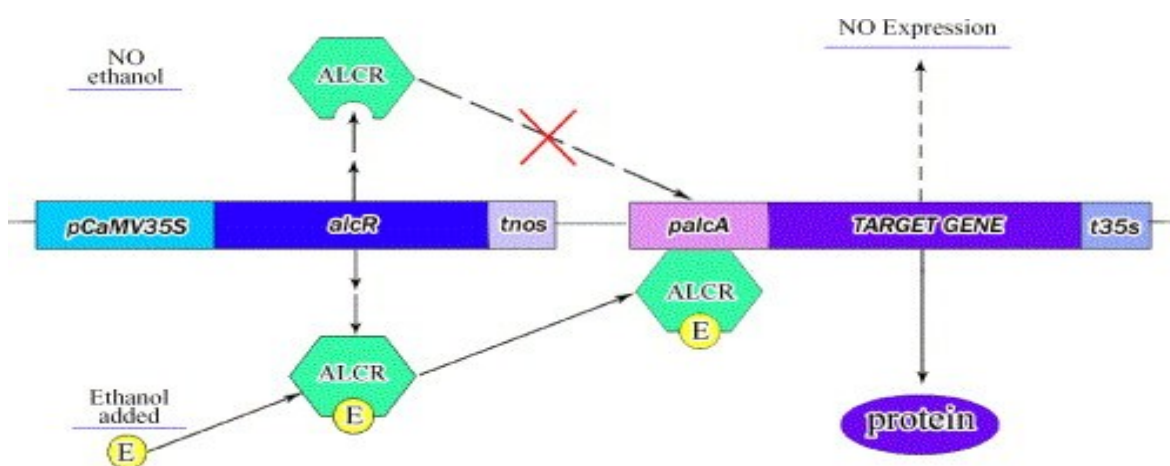


Fig.4.14: Rappresentazione del sistema Alcol inducibile (Li *et al.*, 2005).

Il plasmide presenta un gene di resistenza alla kanamicina, essenziale per la selezione dei trasformanti. La cassetta di espressione delimitata da sequenze del T-DNA definite *left e right border*, presenta al suo interno il gene *Htr1*. Il gene eterologo presenta all'estremità 5' una sequenza codificante per il peptide segnale della proteina Pr1b di tabacco (Dixon *et al.*, 1991), in grado di veicolare il prodotto proteico nell'apoplasto, mentre all'estremità 3' si trova una sequenza di 30 paia di basi codifica per l'epitopo myc (EQKLISEEDL) per il quale è disponibile in commercio un anticorpo monoclonale.

4.2.1 Trasformazione di pomodoro

Per la trasformazione genetica sono stati utilizzati 816 espianti cotiledonari, da cui sono stati ottenuti 510 calli derivanti da singolo espianto. Da ogni callo rigenerato è stato staccato un germoglio e posto su substrato di radicazione, ottenendo 63 germogli che hanno sviluppato un apparato radicale. I calli e i germogli ottenuti non hanno mostrato nel tempo differenze fenotipiche rispetto ai relativi controlli. In seguito sono stati selezionati espianti derivanti da eventi di trasformazione indipendenti e dalle piantine ottenute in vitro solo 40 sono riuscite a superare lo stress provocato dal trasferimento in vivo, queste sono state denominate HTR e numerate in maniera progressiva.

4.2.2 Screening molecolare delle piante transgeniche

Le 40 piante putativamente transgeniche sono state sottoposte a *screening* molecolare per verificare la presenza della cassetta di espressione del plasmide pBin19::HytraETOH#1-SP. A tale scopo è stato estratto e quantificato il DNA genomico da foglia. La quantificazione è stata effettuata confrontando l'intensità delle bande dei campioni estratti con quelle appartenenti a quantità note del DNA del fago λ (Promega). In figura 4.15 è riportato un esempio di quantificazione dove la maggior parte dei campioni, risultano avere una concentrazione compresa tra i 100 e i 150 ng/ μ l.

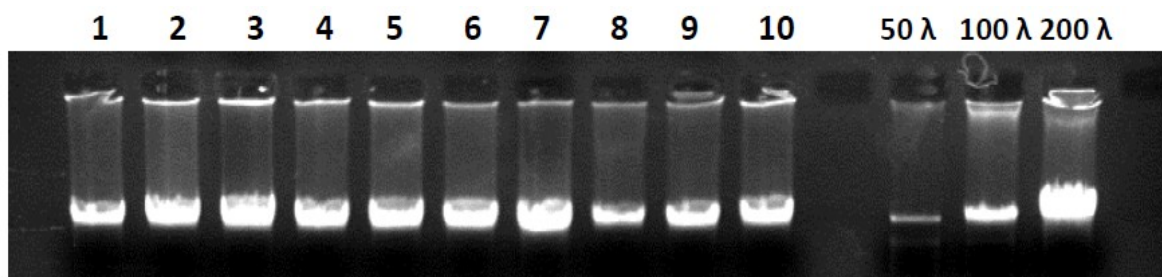


Fig 4.15: Elettroforesi del DNA genomico estratto. Lane 1-10 DNA genomico estratto da alcune piante HTR1 (HTR1-2, HTR1-4, HTR1-6, HTR1-22, HTR1-23, HTR1-24, HTR1-25, HTR1-26, HTR1-A, HTR1-B); Lane 12-14: DNA del fago λ rispettivamente 50ng, 100 ng e 200 ng (Promega);

Per identificare i trasformanti è stata allestita una reazione PCR utilizzando i primer Htr1 Fw e Htr1 Rw, capaci di amplificare l'intera sequenza genica (213 bp) presente all'interno del T-DNA. La figura 4.16 mostra la separazione degli amplificati su gel di agarosio all'1,5% e la presenza di frammenti delle dimensioni attese. Lo *screening* molecolare a cui

è stata sottoposta la progenie T₀ ha identificato 27 piante effettivamente trasformate e sulla base di questi dati è stata calcolata un'efficienza di trasformazione del 3,30%.

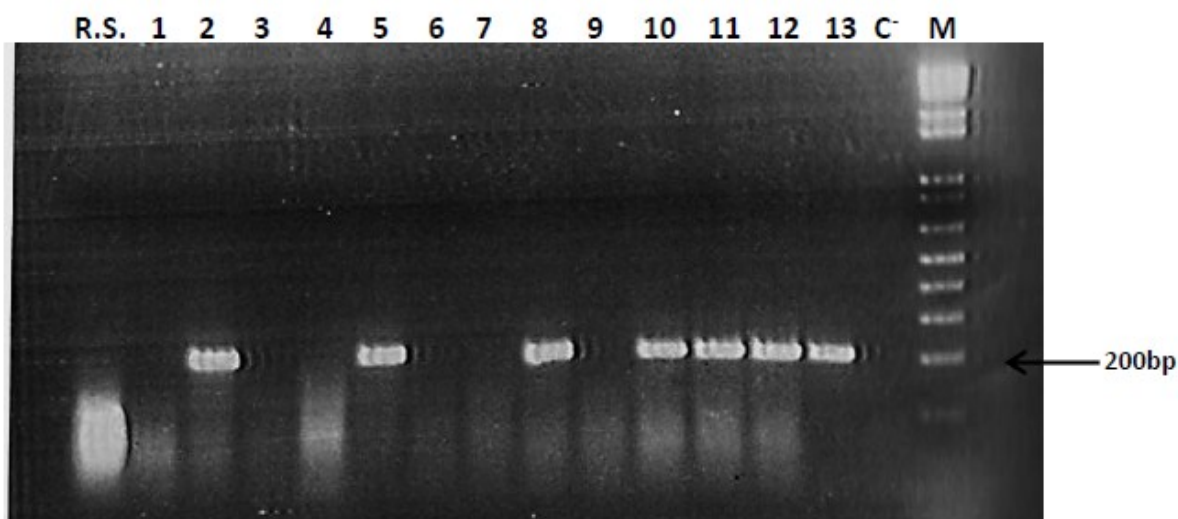


Fig.4.16 Visualizzazione su gel dei prodotti PCR mediante elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione del gene HTR1. Lane1: amplificazione DNA cv Red Setter; Lane2-14: Amplificazioni DNA genomico piante HTR1(HTR1, HTR1-2,HTR1-6, HTR1-7, HTR1-8, HTR1-10, HTR1-11, HTR1-12, HTR1-16, HTR1-18, HTR1-20, HTR1-22); Lane 15: Controllo contaminazioni; Lane 16: Marker1 Kb Plus Ladder (Invitrogen)

4.2.3 Caratterizzazione molecolare e fenotipica

4.2.3.1 Southern Blot

Piante appartenenti alla genenrazione T₁ sono state sottoposte a caratterizzazione molecolare e fenotipica. L'analisi Southern ha avuto lo scopo di stabilire il numero di inserzioni del transgene in ciascun genotipo. I genotipi transgenici analizzati sono 12 e di ciascuno di essi sono state analizzate in media 3 piante di cui è stato estratto il DNA. La qualità e la concentrazione del DNA estratto è stata determinata mediante il confronto visivo con quantità note di DNA del fago λ , come descritto in precedenza. Le piante risultate positive allo screening sono state trasferite in vaso e analizzate nel numero di inserzioni del transgene mediante Southern Blot e successivamente valutate nel loro *habitat* mediante analisi fenotipica.

Nonostante il Southern Blot sia una tecnica classica ben conosciuta, lo sviluppo di una metodologia non radioattiva è di più recente acquisizione e si avvale dell'uso della digossigenina, uno steroide presente in natura nelle foglie ed infiorescenze della *Digitalis purpurea* o *Digitalis lanata*. Tale tecnica sfrutta la capacità della digossigenina di legarsi al

5' dell'uridintrifosfato ed essere incorporata facilmente dalla DNA polimerasi all'interno della sonda ottenuta mediante reazione PCR (Fig.4.17).

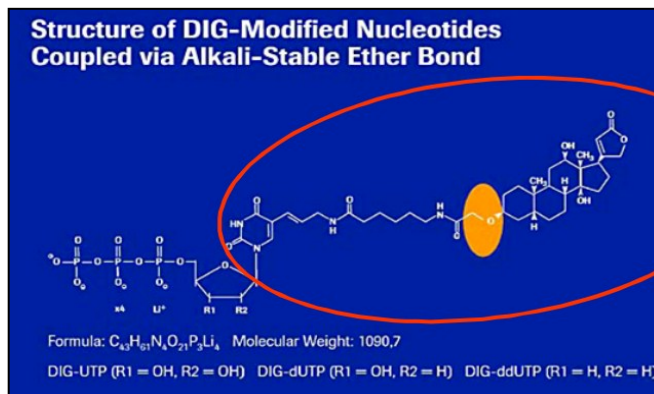


Fig.4.17: Molecola di digossigenina legata all' uridintrifosfato

La sonda complementare al gene *Htr1* è stata sintetizzata mediante una reazione PCR utilizzando il plasmide pBin19::HytraETOH#1-SP come template, i nucleotidi marcati con digossigenina e primer specifici per il gene *Htr1*. E' stata, inoltre, eseguita in parallelo una reazione di amplificazione con dNTP non marcati come controllo. Infatti, i prodotti di entrambe le amplificazioni sono stati separati e confrontati mediante elettroforesi su gel (Fig 4.18) ottenendo bande di peso molecolare di poco superiore a 213 bp per i campioni dove sono stati impiegati dNTPs con digossigenina, mentre nei controlli dove sono stati impiegati dNTPs non marcati presentano amplificati di peso molecolare atteso, ovvero 213 bp.

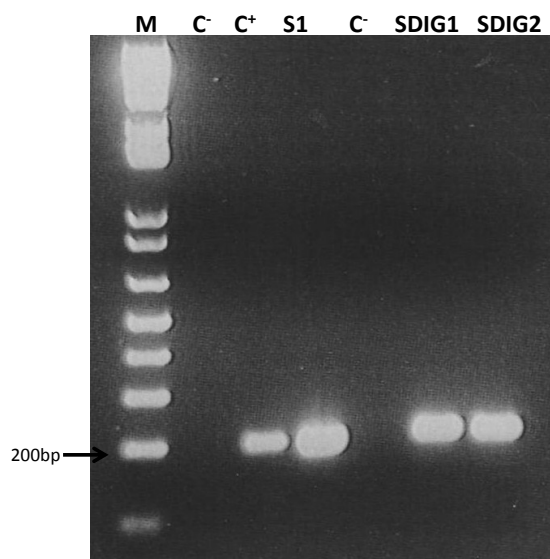


Fig.4.18:Prodotti PCR nella sintesi della sonda marcata con Digossigenina. Lane 1: 1Kb Plus Ladder (Invitrogen); Lane 2: C⁻:controllo negativo; Lane 3: C⁺: controllo positivo DNA genomico HTR1; Lane4: amplicone ottenuto dalla MIX senza DIG; Lane5: C⁻: controllo negativo MIX DIG; Lane 6-7: SDIG1, SDIG2, amplicone in doppia replica ottenuto con la MIX DIG.

Il DNA delle piante risultate positive all'analisi PCR è stato digerito con un' endonucleasi di restrizione *EcoRI* che presenta un unico sito di taglio all'interno della cassetta di espressione tra il CaMV35S ed il AlcR(Fig 4.19).

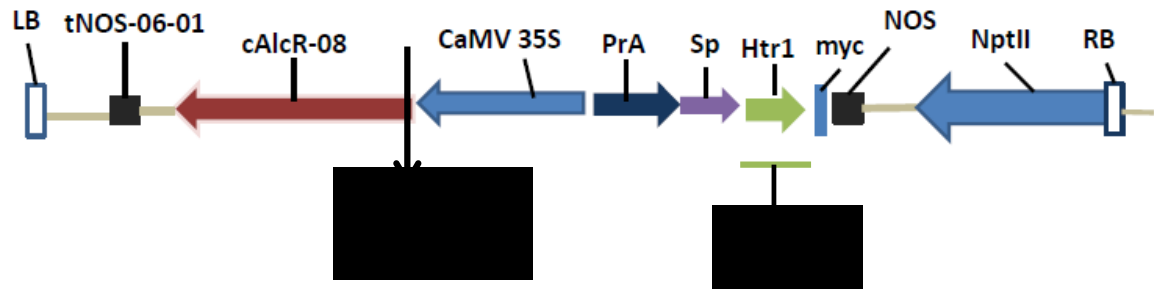


Fig.4.19: Cassetta di espressione inserita in pianta mediante trasformazione. La cassetta presenta due unità trascrizionali, la prima sotto il promotore 35S e la seconda sotto il promotore alcR; l'enzima di restrizione *EcoRI* produce un taglio unico tra le due; la sonda con digossigenina è complementare alla sequenza di *Htr1*

La verifica dell'avvenuta digestione enzimatica è stata eseguita mediante corsa elettroforetica dei prodotti di digestione su gel di agarosio allo 0,7%. Come mostra la figura 4.20, la digestione è avvenuta con successo per tutti i campioni data la presenza dei caratteristici *smear*.

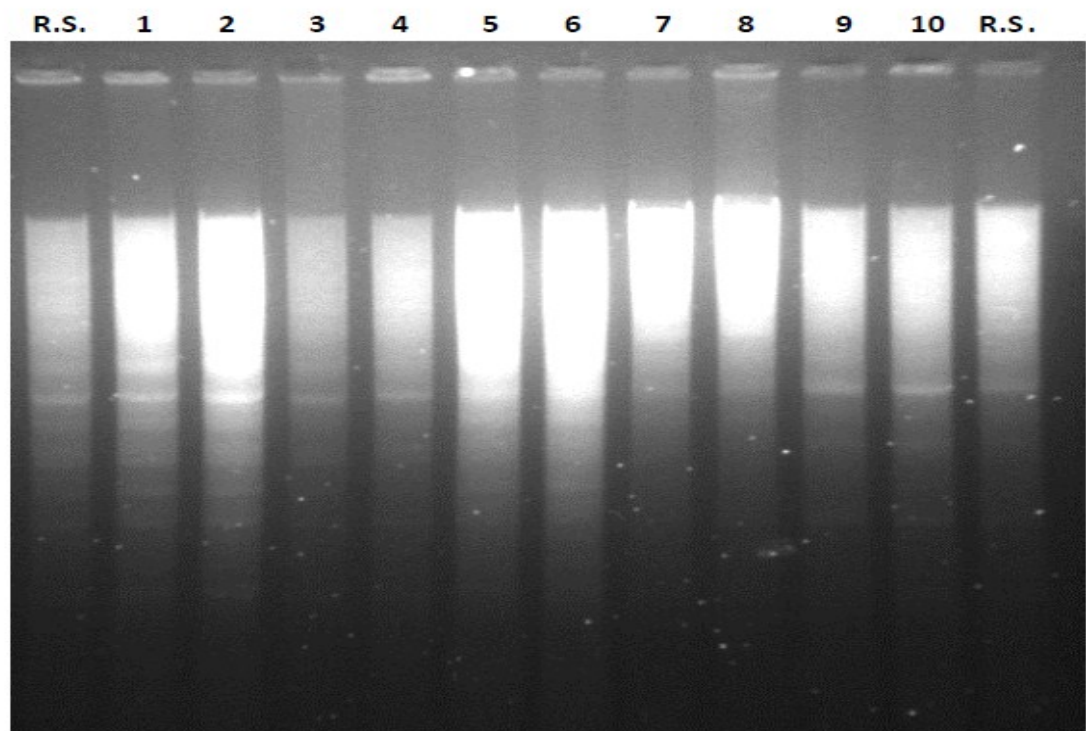


Fig 4.20: Separazione elettroforetica dei frammenti di DNA digeriti con l'enzima di restrizione *EcoRI*.: Lane1 e 12: DNA genomico Red Setter; Lane 2-11: Digestione di DNA genomico di genotipi HTR1 (HTR1-2.21, HTR1-4.4; HTR1-8.3; HTR1-14.17; HTR1-15.2; HTR1-19.4; HTR1-19.14; HTR1-22.7; HTR1-22.9)

Dopo la corsa elettroforetica i frammenti di DNA sono stati denaturati e neutralizzati mediante lavaggio del gel in opportune soluzioni. Una volta trasferito sul filtro, il DNA è stato fissato tramite esposizione ai raggi UV per la successiva ibridazione con la sonda marcata. Le condizioni di ibridazione sono state scelte in modo da massimizzare la quantità di sonda legata al bersaglio ed evitare legami aspecifici tra sonda e il DNA.

Il legame tra la sonda e il DNA è rivelato mediante una reazione chemi-luminescente. La sonda marcata con digossigenina viene riconosciuta da un sistema immuno-enzimatico che utilizza un anticorpo contro la digossigenina coniugato con la fosfatasi alcalina (anti-DIG). Il complesso sonda-anticorpo può essere rilevato mediante l'inserimento di un substrato della fosfatasi alcalina che rilascia un prodotto chemi-luminescente in grado di impressionare una lastra autoradiografica.

Esempi di scansioni di lastre che mostrano il numero dei loci T-DNA inseriti mediante trasformazione nei genotipi HTR1 sono mostrati nella figura 4.21 (A e B). Le piante "Red Setter" non trasformate, come previsto, non presentano bande a conferma dell'assenza del gene fungino nel genoma del pomodoro. Nelle piante HTR1 il numero di inserzioni del gene varia a seconda delle linee e in alcuni casi anche tra piante appartenenti alla stessa linea. Come mostrato in figura 4.21A e B, tutte le piante analizzate della linea HTR1-15 presentano 5 copie del gene, mentre le piante della linea HTR1-18 presentano un'unica inserzione del gene. Dall'analisi Southern sono stati, dunque, individuati campioni a singola copia del transgene che sono i seguenti: HTR1-19.5, HTR1-4.5, HTR1-8.3, HTR1-8.10, HTR1-8.5, HTR1-22.9 ed infine HTR1-18.3 e 18.6.

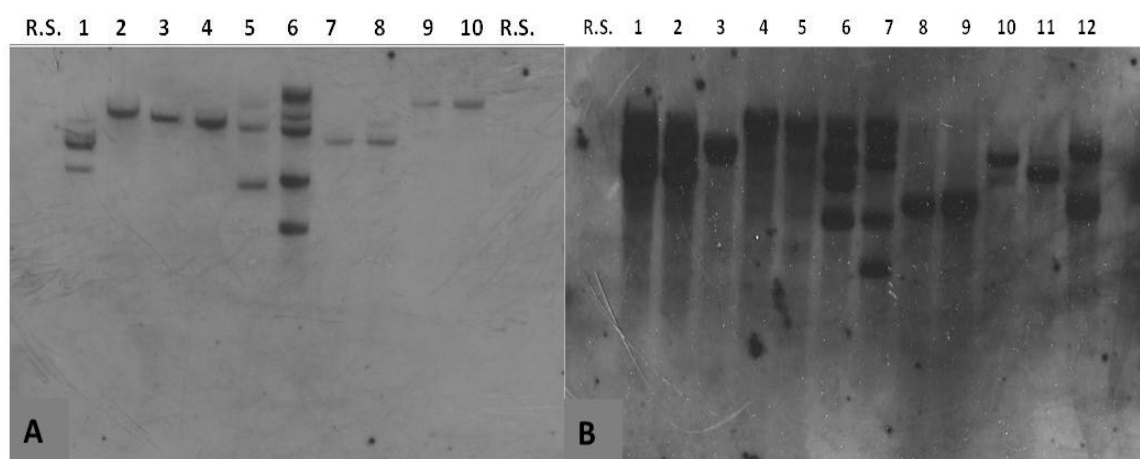


Fig 4.21 A e B: Sviluppo lastra Southern blot. A) Lane 1-12: Red Setter ; Lane 1 e 12: Red Setter; Lane 2-11: DNA genomico campioni HTR1-2.21, HTR1-4.5, HTR1-8.3, HTR1-8.5, HTR1-14.17, HTR1-15.2, HTR1-19.5, HTR1-19.14, HTR1-22.7, HTR1-22.9; B) Lane 1: Lane 2-13: DNA genomico campioni HTR1-3.5, HTR1-3.11, HTR1-8.10, HTR1-13.1, HTR1-13.3, HTR1-14.16, HTR1-15.1, HTR1-18.3, HTR1-18.6, HTR1-19.9; HTR1-22.3; HTR1-A.14

4.2.3.2 Analisi fenotipica

Le piante HTR1, provenienti da differenti eventi di trasformazione, hanno mostrato un evidente fenotipo (Fig. 4.22), che solo in alcune piante è risultato più lieve. In generale le piante presentano una riduzione dell'altezza del fusto, mostrando una mancata crescita apicale rispetto le piante controllo ed un elevato numero di germogli laterali.



Fig 4.22: Confronto tra i vari fenotipi delle piante HTR1 e il controllo non trasformato “Red Setter”

Anche tra piante di genotipi a singola copia sono osservabili entrambi i fenotipi (Fig.4.23), suggerendo che il fenotipo osservato è indipendente dal numero delle copie di T-DNA inserite nel genoma di pomodoro. Differenze fenotipiche sono state riscontrate anche nell'apparato radicale delle piante HTR1 mostrando in queste ultime radici meno fitte e più spesse rispetto ai controlli (Fig. 4.24).

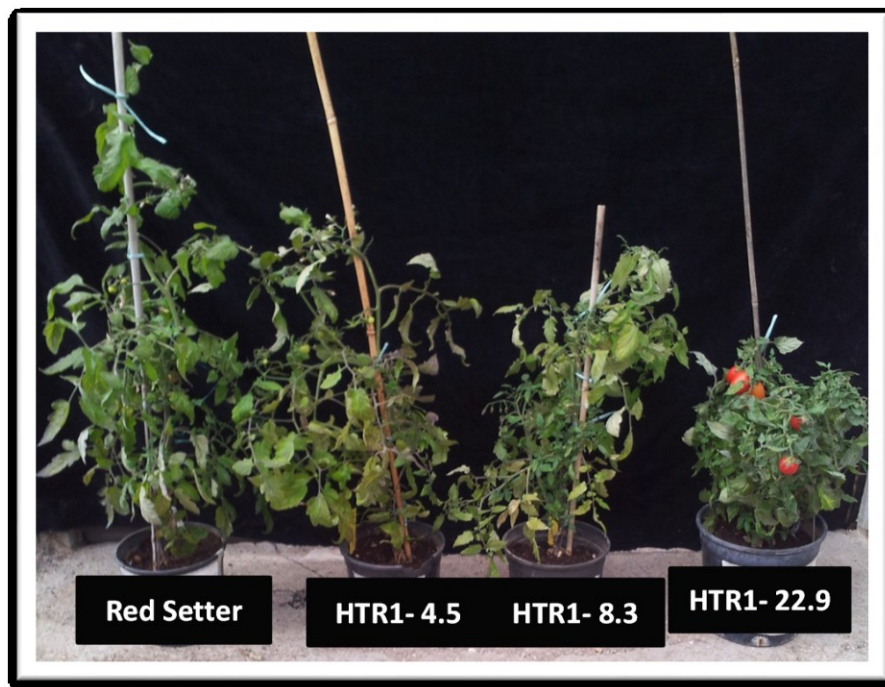


Fig 4.23: Confronto tra i vari genotipi HTR1 risultanti a singola copia nell'analisi Southern e il controllo Red Setter

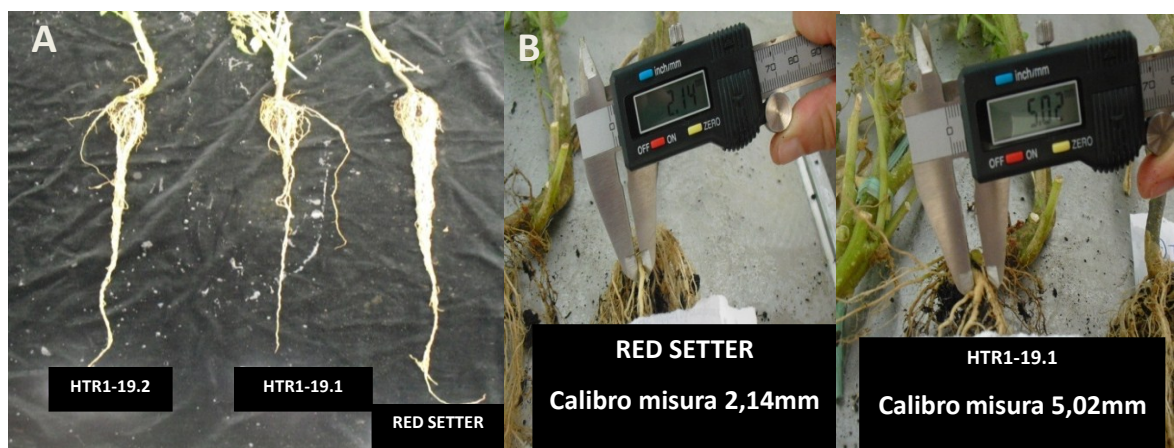


Fig.4.24: Analisi fenotipica dell' apparato radicale. A) Confronto apparato radicale di piante "Red Setter" e HTR1-19; B) Misurazione spessore radici

Le forti modifiche del fenotipo registrate in pianta potrebbero essere causate dall'espressione della proteina eterologa, nonostante l'assenza dell'induttore. Essa, infatti, potrebbe interferire con alcuni *pathway* metabolici, come ad esempio quello delle auxine, giustificando in tale modo l'eccessivo numero di germogli laterali. Tale fenomeno è stato riscontrato in piante di *Arabidopsis* trasformate con lo stesso sistema: Roslan e collaboratori (2001) osservano che il 13% dei trasformanti esprimevano la proteina in assenza di induzione.

4.2.3.3 Analisi RT-PCR

Con lo scopo di verificare la presenza del trascritto Htr1 in pianta, è stata allestita un'analisi RT-PCR con primer specifici per il gene.

E' stato isolato l'RNA da foglia ed è stato quantificato mediante analisi spettrofotometrica. Tutti i campioni hanno presentato concentrazioni ridotte di proteine, fenoli, carboidrati e composti aromatici, mostrando un rapporto A_{260}/A_{280} molto vicino a 2. La qualità dell'RNA estratto è stata valutata mediante elettroforesi su gel. La figura. 4.25 A mostra un esempio di RNA di buona qualità in quanto bande nette e ben definite dell'RNA ribosomiale sono visibili per la gran parte dei campioni. L'RNA di cui sono state verificate sia integrità che qualità, è stato poi sottoposto a trattamento con DNAsi per eliminare eventuali contaminazioni di DNA genomico ed è stato successivamente adoperato per la sintesi di cDNA così come effettuato per il gene TnBVank1 in tabacco (Fig. 4.25B).

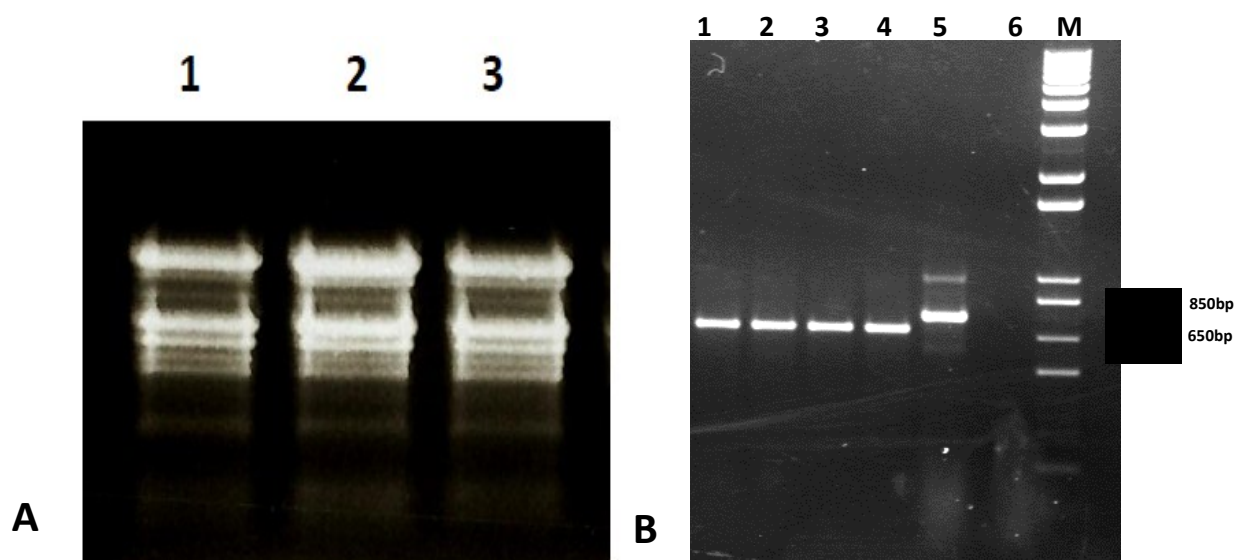


Fig.4.25 A-B: A)Valutazione della qualità dell'RNA estratto mediante elettroforesi su gel di agarosio di RNA estratto da piante HTR1 (numeri indicati in figura); B) Visualizzazione su gel dei prodotti di amplificazione del gene *EF1α* di piante transgeniche su gel di agarosio. Lane1: Controllo Red Setter; Lane 2-4: Campioni HTR1Lane 5: C⁺: Controllo positivo; Lane 6: C⁻: controllo negativo; Lane7: marker 1 kb-plus DNA ladder (Invitrogen);

L'analisi RT-PCR del RNA estratto effettuata con primer Htr1Fw e Htr1Rw, che amplificano un frammento di circa 200bp, ha rivelato la presenza del trascritto in tutte le piante transgeniche. Un esempio di RT-PCR per alcuni capioni è mostrato in Fig. 4.26.

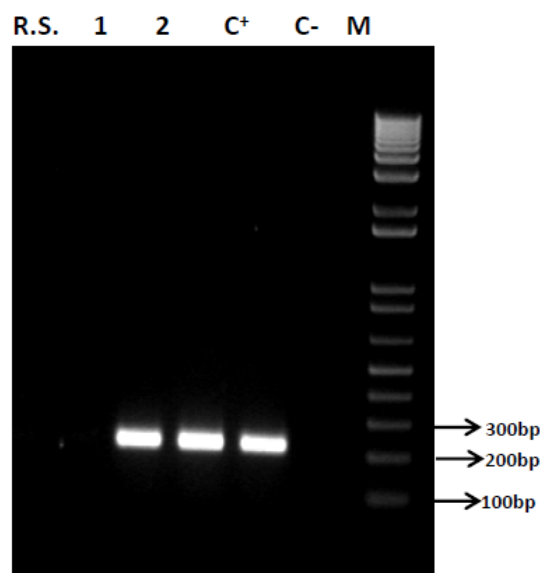


Fig. 4.26: Visualizzazione sul gel di agarosio del trascritto Htr1. Lane1: Controllo Red Setter; Lane 2-3: Campioni HTR1-A e HTR1-2; Lane 4: C⁺: Controllo positivo; Lane 5: C⁻: controllo negativo; Lane6: marker 1 kb-plus DNA ladder (Invitrogen)

4.2.3.4 SDS-Page e Western Blot

La conferma dell'avvenuta trascrizione del transgene ha portato alla conseguente investigazione sulla presenza della proteina eterologa in pianta mediante un'analisi Western Blot. Le proteine totali sono state estratte da tessuto fogliare con tampone denaturante a causa della loro elevata idrofobicità e analizzate in SDS-PAGE e Western Blot con l'impiego dell'anticorpo anti-myc. L'SDS-page (Fig.4.27A) con colorazione Comassie Blue ha rivelato lo stesso profilo proteico sia per i campioni estratti da piante trasformate che per quelli estratti dal controllo "Red Setter". L'ibridazione dell'anticorpo anti-myc con il filtro contenente le proteine totali (Fig.4.27B) ha rivelato segnali molto deboli corrispondenti a bande multiple, che potrebbero essere attribuiti a multimeri della stessa proteina, probabilmente favoriti dall'elevata idrofobicità della stessa (Hektor and Scholtmeijer, 2005). Infatti in letteratura è riportata la capacità di tali proteine di autoassemblarsi per formare aggregati (Sunde *et al.*, 2007). Poiché il primo segnale rivelato è di circa 17 KDa e la proteina Htr1-myc presenta un peso molecolare di 8.9 KDa, la banda identificata potrebbe corrispondere ad un dimero la cui singola unità è costituita dalla proteina Htr1 processata senza il peptide segnale Sp e quindi una diversa localizzazione cellulare.

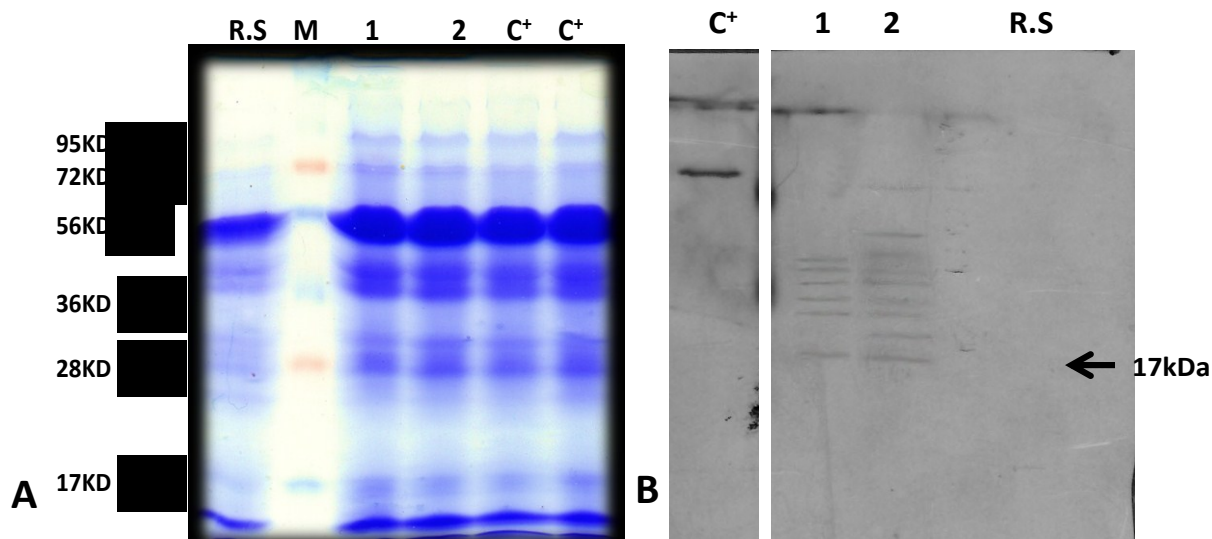


Fig 4.27: A) SDS-Page con colorazione Blu-comassie. Lane1: Controllo negativo Red Setter ; Lane2: Marker Bio RaD ; Lane3-4: HTR-A e HTR2; Lane 5-6: Controllo positivo C^+ . B) Western blot. Lane1: C^+ : Controllo positivo; Lane2-3: piante HTR1; Lane4: Marker; Lane5: Controllo negativo Red Setter

4.2.3.5 Analisi di espressione time-course

Un'analisi Real-Time RT-PCR assoluta è stata effettuata con lo scopo di ricercare una relazione tra la presenza di trascritto e le variazioni fenotipiche osservate. Piante appartenenti ai genotipi HTR1-4.5 e HTR1-8.3, aventi un fenotipo “lieve” e HTR1-19.5 con fenotipo “forte” sono state allevate in vaso ed è stata quantificata la presenza del trascritto HTR1 a una, due e quattro settimane dal trapianto. La retta di taratura (Fig. 4.28A) ottenuta mediante concentrazioni note del plasmide pBin19::HytraETOH#1-SP, presenta l'equazione $y = -2,8095x + 39,55$ e un R^2 pari a 0,99. L'interpolazione dei Ct dei campioni in esame nella retta di taratura, ha consentito il calcolo del numero di molecole del trascritto *Htr1* nei genotipi analizzati. Come si evince dal grafico in figura 4.28B, il numero delle molecole di trascritto non varia consistentemente durante le quattro settimane di allevamento né tantomeno tra i vari genotipi (circa $4 \cdot 10^5$ numero di molecole), fatta eccezione del genotipo HTR1-8.3 che alla quarta settimana esprime in maniera significativa una quantità maggiore del trascritto rispetto gli altri campioni ($12 \cdot 10^5$ numero di molecole).

Tale risultato non ha consentito l'identificazione di differenze significative nell'accumulo dei trascritti né correlazione con l'entità delle modifiche fenotipiche osservate.

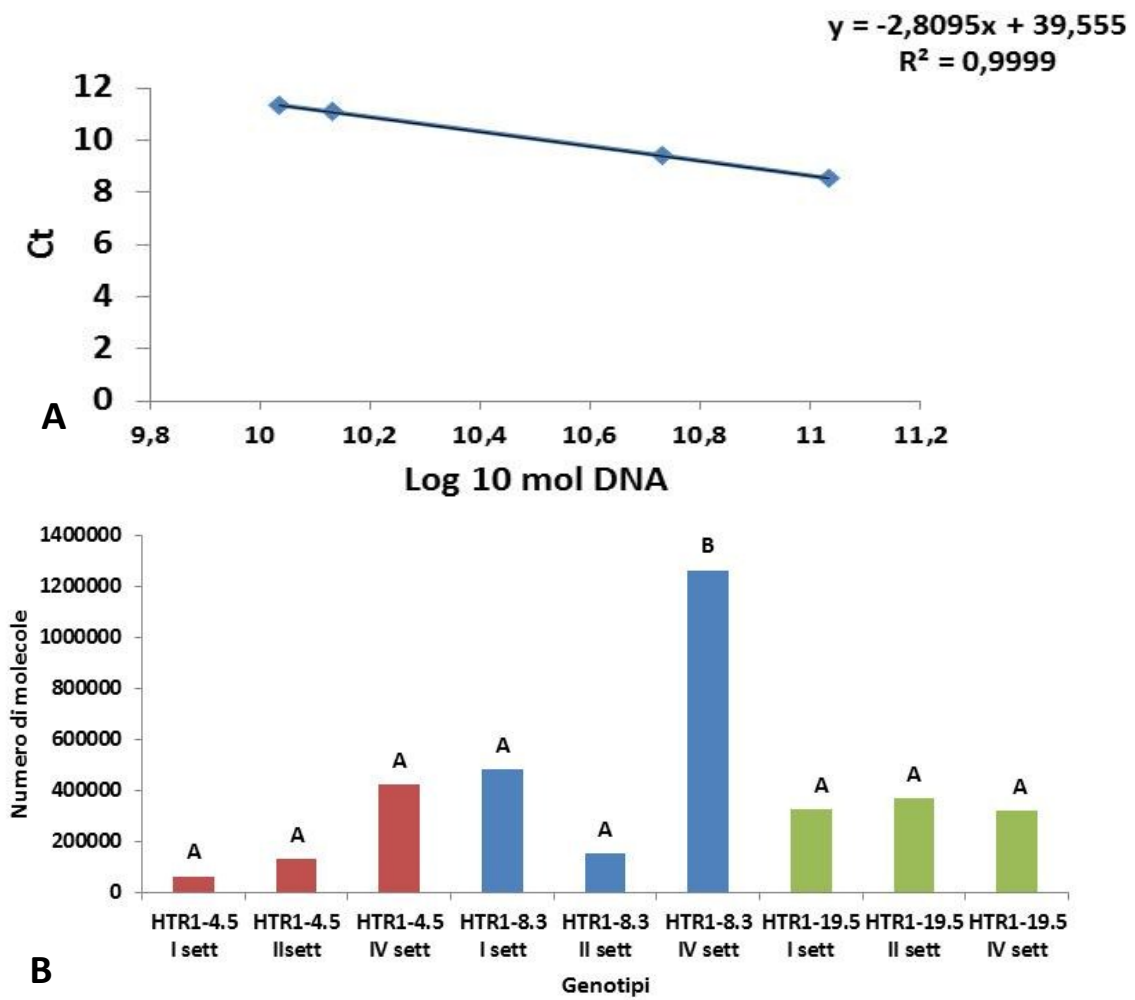


Fig.4.28 A e B: quantificazione dei livelli di trascritto dei genotipi HTR1-4.5, HTR1-8.3 e HTR1-19.5. (A) Retta di taratura; (B) Quantificazione dei livelli di trascritto.

5 DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Lo studio delle relazioni antagoniste insetto/insetto e/o interazioni benefiche pianta microrganismo offre interessanti opportunità per l'identificazione di nuove molecole con potenziale attività pesticida e/o biostimolante utili per la difesa delle colture.

La maggior parte delle perdite delle colture agrarie sono causate da insetti fitofagi (Ferry et al., 2004) e l'impiego di pesticidi chimici ha in parte arginato il problema, ma il loro continuo uso ha avuto ripercussioni sull'ambiente e la salute umana (Budnik e Baur, 2009; Debenest et al., 2010). In questo contesto, le interazioni antagoniste tra insetti parassitoidi ed i loro ospiti forniscono spunti interessanti per l'identificazione di nuovi geni o molecole coinvolte in molte patologie osservate a carico dell'ospite stesso e che potrebbero essere usate per strategie difensive. Gli insetti parassitoidi sono presenti in diversi ordini come ditteri, coleotteri, lepidotteri, ma quelli più comuni sono presenti negli imenotteri. La loro simbiosi con virus appartenenti alla famiglia dei *Polidnaviride* (Polydnavirus), presenti all'interno del calice ovarico e trasferiti nell'ospite al momento dell'ovideposizione con secrezioni ovariche, favoriscono il processo di parassitizzazione. La replicazione del virus avviene solo nel tratto riproduttivo del parassitoide, mentre nell'ospite esso infetta emociti, fat body ed altri tessuti, attivando la trascrizione di geni in grado di sopprimere le difese immunitarie, alterare il sistema endocrino e sviluppo (Webb 1998; Beckage e Gelman 2004), consentendo la crescita del parassitoide all'interno dell'ospite. I PDV sono così considerati simbionti benefici degli imenotteri parassitoidi e lo studio dei fattori virali che interferiscono con la vita dell'ospite è ancora carente. Tali interazioni sono considerate come fonte di geni utili per il controllo di insetti dannosi. Infatti piante di tabacco esprimenti una proteina secreta da teratociti appartenenti ad un imenottero parassitoide (*Microplitis croceipes*), provocano un'aumento della mortalità ed una ridotta velocità di accrescimento nei lepidotteri *Heliothis virescens* e *Manduca sexta* (Maiti et al., 2003).

Il lavoro di tesi descritto, ha previsto lo studio funzionale di due geni il *TnBVank1* e *Htr1*, isolati da organismi antagonisti quali il *Toxoneuron nigriceps* *Bracovirus* ed il fungo *Trichoderma hartianum*, per lo sviluppo di strategie alternative di protezione delle colture da stress biotici.

Il gene virale causa alterazioni nella risposta immunitaria dell'ospite. Per questo motivo lo studio di tale gene e la sua espressione in pianta attraverso le biotecnologie vegetali è considerato un ottimo strumento per la valutazione della sua attività pesticida.

Il gene codifica per una proteina avente domini anchirina, coinvolti in molti processi cellulari quali la trasduzione del segnale, regolazione del ciclo cellulare, integrità del citoscheletro, induzione della risposta immunitaria, sviluppo e sistemi di trasporto (Sedgwick e Smerdon 1999; Malek *et al.*, 2003; Mosavi *et al.*, 2004). Questa proteina è definita come *ikB-like* in quanto risulta essere omologa agli inibitori IκB, regolatori del sistema immunitario di mammiferi ed insetti. I fattori IκB legano nel citosol i fattori trascrizionali NFκB/REL che sono attivatori della risposta immunitaria. In seguito ad uno stimolo esterno le IκB sono fosforilate e rilasciano il fattore di trascrizione che nel nucleo attiva la trascrizione di geni. L'assenza nella proteina virale del dominio N-terminale SRD (Signal Receiving Domain), necessario per la fosforilazione, e del dominio PEST, coinvolto nel turnover (Ghosh and Karin 2002), causa un legame irreversibile del TnBVank1 con il fattore NFκB, interferendo con il *pathway* di trasduzione del segnale (Falabella *et al.*, 2007). Tale capacità è stata attribuita anche alle proteine N5 e H4 del MdBV (*Micropolis Demolitor Bracovirus*) capaci di inibire la risposta immunitaria (Thoetkiattikul *et al.*, 2005) e di ridurre l'espressione di geni regolati da NFκB in cellule S2 di *Drosophila*. Sistemi analoghi sono stati identificati non solo in virus, ma anche in batteri come *Ehrlichia chaffensis*, l'agente eziologico dell' ehrlichiosi umana. La proteina di questo batterio AnkA forma un legame irreversibile con il fattore di trascrizione NFκB, riducendo la produzione di citochinine e favorendo così l'infezione dello stesso (Huang *et al.*, 2008).

Allo scopo di valutare un possibile effetto del gene *TnBVank1* nella difesa delle piante è stata effettuata un'analisi trascrittomica di piante di tabacco esprimenti in maniera stabile il gene. L'analisi ha confermato anche in pianta l'effetto inibitorio del gene. Esso infatti, modula in maniera negativa l'espressione della maggior parte dei geni, in particolar modo quelli relativi alle risposte a stress biotici. La sovraespressione di geni che regolano la trascrizione di proteine segnale ricche in leucina come le *leucine-rich-repeat* (LRR) e geni appartenenti allo stress ossidativo come la superossido dismutasi, fanno ipotizzare un cambiamento dello stato ossidativo cellulare, causando un maggiore stato di allerta da parte delle piante transgeniche nei confronti di stimoli esterni e di trasmissione dei segnali di risposta. La presenza tra i geni down-regolati di fattori di trascrizione che regolano l'attivazione di geni di difesa, suggerisce un ruolo di inibizione della trascrizione di geni associati alle risposte di difesa similmente a quanto accade nell'insetto parassitizzato. L'impatto che il gene *TnBVank1* ha sul trascrittoma di tabacco è stato poi confrontato con il suo effetto in condizioni di elicitazione con capsiceina (transgenico elicitato su

transgenico), un noto elicitore fungino isolato da *Phytophthora capsici*, in grado di attivare la risposta sistemica in pianta (Ricci *et al.*, 1989; Bonnet *et al.*, 1996).

L'effetto dell'elicitazione sul trascrittoma delle piante transgeniche risulta nella induzione di molti geni di difesa tra cui diverse classi di PR-protein, e di inibitori di proteasi, suggerendo l'attivazione di risposte coordinate da SA e JA. L'espressione di alcune classi di inibitori di proteasi nelle piante ANK in seguito ad elicitazione, ha fatto supporre una possibile attività del transgene nell'amplificazione dell'attesa induzione di questi geni a seguito della presenza di larve di lepidottero che si alimentano sulle piante. E' noto che esiste una correlazione tra il contenuto di inibitori di proteasi e la resistenza ad erbivori (Li *et al.*, 2004; AbuQamar *et al.*, 2008) infatti, il ruolo degli inibitori di proteasi è quello di interagire con le proteasi dell'intestino medio degli erbivori ed inibire la loro attività proteolitica legando in modo competitivo il sito attivo dell'enzima (Habib e Fazili, 2007). Gli inibitori di proteasi I, sono stati identificati in molte specie vegetali come orzo, patata e tabacco, ed attivati in seguito a *wounding* sia nel sito locale al danno che in quello distale. Sintetizzati nel citoplasma, sono generalmente accumulati nel vacuolo, dove in seguito a danno meccanico sono rilasciati mediante il processamento di un precursore avente massa molecolare maggiore (Nelson e Ryan, 1980). In letteratura è riportata la loro attività contro le proteasi di insetti fitofaghi, infatti l'aggiunta di inibitori di proteasi Kunitz provenienti da soia, a dieta artificiale, inibiscono la crescita di *Tribolium confusion* e di *Heliothis virescens* (Dunaevsky *et al.*, 2004).

L'effetto dell'elicitore sulla regolazione dei profili di espressione di geni di difesa del tabacco è stata valutata nel confronto wild type elicitato su wild type. In questo caso l'assenza del carattere inibitorio del gene *TnBVank1* si osserva in maniera palese, dato il maggior numero di geni differenzialmente espressi rispetto alle altre condizioni in esame. Come atteso (Keller *et al.*, 1996) i geni differenzialmente espressi codificano per inibitori di proteasi, PR-protein e proteine segnale come LRR, chinasi e proteine di risposta a virus RTM1. In questo confronto la sovraespressione di geni relativi al burst ossidativo come l'ascorbato perossidasi e citocromo p450, confermano l'attivazione delle prime risposte di difesa attivate dalla pianta in seguito al riconoscimento dell'elicitore patogeno (Gozzo 2003). Risultano sovraespressi anche geni impegnati nella modifica della parete cellulari come la *pectina metilesterasi*, *caffeic acid 3-o-methyltransferase* e *idrolasi*. La sovraespressione di questi enzimi, come ad esempio la *pectina metilesterasi*, riportata in letteratura da Raiola e collaboratori (2010), rivela che l'enzima è sovraespresso in piante di *Arabidopsis* in seguito all'inoculo di due patogeni come *B.cinerea* e *P. carotovorum*,

risultando essere necessaria per il patogeno durante la colonizzazione dei tessuti. La comunanza di diversi geni differenzialmente espressi con la precedente condizione in esame (transgenico elicitato su transgenico) porta alla deduzione che l'effetto del gene *TnBVank1* abbia un ruolo di *enhancer* sul trascrittoma di tabacco. Infatti, confrontando i valori di espressione dei singoli geni ottenuti dal microarray, le PR-1 nelle piante ANK risultano essere sottoesprese con valori di *Fold Change* (FC) pari a 0.4, l'elicitazione su piante ANK, ha incrementato il loro valore fino a FC pari a 23. Anche l'inibitore delle carbossipeptidasi risulta sottoespresso in piante ANK con un FC pari a 0.48, mentre in seguito all'elicitazione la sua espressione incrementa con un FC di circa 3. Tale effetto potrebbe essere correlato alla capacità del gene *TnBVank1* di sostituirsi a proteine ortologhe di *TnBVank1*, cioè proteine *ikB-like* di pianta nel legume con fattori trascrizionali, inibendo la trascrizione di geni specifici. Infatti, tali ortologhi, pur presentando una bassa similitudine strutturale di sequenza con la proteina virale, in virtù dell'omologia funzionale ed essendo presenti in concentrazioni maggiori rispetto al prodotto dell'ortologo di tabacco, possono legarsi a specifici fattori di trascrizione, anche se il legame è probabilmente poco forte. Per tale motivo, in presenza di uno stimolo esterno, il prodotto del transgene può liberare più facilmente il fattore di trascrizione e quindi consentire la trascrizione genica. Tra le proteine *ikB-like* presenti in pianta vi è *NPRI* considerato il regolatore centrale della SAR. Questa proteina è composta da un dominio anchirina ed un dominio BTB/POZ. La proteina è presente in forma oligomerica nel citoplasma, ma in seguito al cambiamento dei livelli di SA e dello stato red ossidativo della cellula, vi è la riduzione dei ponti disolfuro e la traslocazione in forma di unità monomeriche nel nucleo dove interagisce con fattori trascrizionali ed attiva la trascrizione di geni impegnati nella difesa (Voronin *et al.*, 2007). In questo caso la proteina virale potrebbe legare tale fattore inibendo l'attivazione dei geni di difesa. In tabacco la proteina *NtANK1* è una *ikB-like*. Il gene risulta essere un regolatore negativo del fattore *BZ1-1*, coinvolto nella via di trasduzione dell'auxina in seguito ad attacco di patogeni, in particolare nella risposta ipersensibile (Kuhlmann *et al.*, 2003). Un omologo di *NtANK1* in *Arabidopsis* è *AtAKR2*, anch'essa coinvolta nella difesa. *AtAKR2* è impegnata nella regolazione dei livelli di perossido di idrogeno e funge da chaperone molecolare di un *ascobato perossidasi* (APX3) che traslocato sulle membrane dei perossisomi, incrementa la degradazione della molecola (Shen *et al.*, 2010). L'alterazione dello stato red ossidativo delle piante transgeniche dall'analisi microarray fa supporre un'interferenza del prodotto transgenico con le APX3, inoltre data la capacità di tale proteina di interagire con le membrane (Dong 2004), potrebbe associarsi ed inibire l'attività delle APX3. Tale effetto potrebbe essere verificato

mediante co-immunoprecipitazione effettuata sulla proteina virale ed APX3 su protoplasti delle linee transgeniche.

L'ultimo confronto ha valutato l'effetto del solo transgene sul solo trascrittoma di tabacco in condizioni di elicitazione (transgenico elicitato su wild type elicitato). Anche in questo caso è visibile il carattere inibitorio del gene in quanto la maggior parte dei geni risultano essere sottoespressi. Tra il ridotto numero dei geni up-regolati vi sono le PR-protein e varie classi di inibitori di proteasi mostrando la incrementata capacità delle piante transgeniche di rispondere a stimoli esterni. Appartenenti alla categoria dei down-regolati vi sono geni coinvolti nella biosintesi della lignina (*Caffeato 3-O-methyltransferase 1*) e nella biosintesi della parete cellulare (*pectinmetilesterasi*, *proteine ricche di cisteine*), che potrebbero far ipotizzare una possibile suscettibilità da parte delle piante, nei confronti di funghi patogeni, in particolar modo necrotrofi. Infatti, il silenziamento del gene *caffeic acid 3O-methyltransferase (comt)* in *Medicago sativa*, causa una diminuzione della sintesi della lignina (Guo *et al.*, 2001; Marita *et al.*, 2003), inoltre il suo silenziamento in mais, ne causa una maggiore suscettibilità a *Blumeria graminis* f.sp.*tritici* (Bhuiyan *et al.*, 2009). La parete cellulare è considerata come difesa costitutiva della pianta, la prima linea di difesa che essa ha a disposizione contro gli attacchi di agenti biotici e le sue modificazioni in seguito di questi attacchi di agenti biotici, possono incrementare tale barriera con un ulteriore rafforzamento della lignina (Mellersh and Heath 2001; Hématy *et al.*, 2009). Il fenomeno della lignificazione, consente alla pianta di reagire in modi diversi all'attacco, infatti essa può stabilire una barriera e proteggersi da molecole quali enzimi o tossine rilasciate dal patogeno e può favorire la formazione di strutture adibite all'intrappolamento del patogeno (Nicholson *et al.*, 1992). E' riportato in letteratura che in seguito all'attacco provocato da *B. cinerea* in grano e carota, vi è l'incremento dell'attività degli enzimi coinvolti nella lignificazione (Lloyd *et al.*, 2011).

La sottrespressione dei geni appartenenti al *burst ossidativo (nadh dehydrogenase e perossidasi)*, supporta la teoria della modificazione della parete cellulare, in quanto tra le prime difese attuate dalle piante in seguito ad attacco c'è la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) con conseguente *burst ossidativo*. Le molecole prodotte da tale processo, hanno un ruolo preciso nella difesa, in quanto i ROS accumulati nello spazio intercellulare, hanno funzione tossica nei confronti di molti invasori, mentre H₂O₂, impegnati nel rafforzamento della parete cellulare, mediano la formazione di legami crociati tra le glicoproteine di parete ricche di idrossiprolina (Hématy *et al.*, 2009). L'incremento di H₂O₂ risulta essere causa di una maggiore resistenza a funghi necrotrofi,

infatti piante di pomodoro, mutanti geni coinvolti nella sintesi dell'acido abscissico, presentano un incremento di H_2O_2 nelle cellule dell'epidermide rispetto alle piante controllo ed appena 4 ore dopo l'infezione del patogeno, mostrano una maggiore resistenza al fungo *Botrytis cinerea* (Asselbergh *et al.*, 2007). Tra i down-regolati inoltre, sono presenti geni che codificano per recettori di membrana (*l'abscisic acid receptor pyl4*) dell'acido abscissico (ABA) e fattori di trascrizione (*Wrky10*) regolati dallo stesso ormone che indicano un crosstalk tra JA e ABA. E' possibile così ipotizzare che una minore stabilità della parete cellulare, associata a una minore attivazione del *burst ossidativo*, renda le piante più suscettibili a fitopatogeni. Tale teoria dovrà essere validata in seguito mediante opportuni saggi biologici e analisi molecolari più approfondite, come ad esempio la spettrometria di massa che dà la possibilità verificare la reale composizione della parete nelle piante trasformate. La down-regolazione di geni impegnati nei processi di sviluppo come le kinesine, conferma l'omologia tra il sistema pianta insetto, in quanto linee germinali di *Drosophila*, esprimenti il *TnBVank1* mostrano l'interferenza del gene virale con l'organizzazione del citoscheletro (Duchi *et al.*, 2010), nelle piante ANK elicitate la kinesina, che regola la citokinesi e la formazione del citoscheletro (Hepler *et al.*, 2002), mostra una sottoespressione, facendo ipotizzare anche in pianta una modifica del citoscheletro. In conclusione è possibile affermare che il *TnBVank1* influenza negativamente geni di difesa contro funghi e positivamente geni di difesa contro insetti. Per verificare una eventuale protezione delle piante transgeniche contro erbivori, è stato allestito un saggio di induzione con il lepidottero *Spodoptera littoralis* ed è stato valutato il profilo di espressione del gene *PinII* (inibitore di proteasi II), sia nelle foglie attaccate dal fitofago che in quelle distali. Infatti è noto che tale gene è attivato sia nel sito di attacco del fitofago che nelle foglie distali (Koiwa *et al.*, 1997). Come già detto, gli inibitori di proteasi, inizialmente identificate in tuberi di patata (Christeller and Liang, 2005), hanno un'elevata attività antimetabolica nei confronti di insetti erbivori (Koiwa *et al.*, 1997; Chen, 2008) e vengono sintetizzati dalla pianta in seguito alla loro presenza, legandosi alle proteasi digestive nell'intestino dell'insetto e inibendo l'assimilazione dei nutrienti. La loro diretta relazione con le risposte di difesa, è stata saggiata per la prima volta su foglie di piante di pomodoro e di tabacco dove è stato visto l'incremento di inibitori di tripsina e chimotripsina in seguito a ferita provocata da *Lipidoptera decemlineata* (Green e Ryan 1972). Oltre ad avere un'azione contro insetti, queste proteine esercitano ruoli importanti, come proteine di riserva, regolazione dell'attività proteasica endogena, modulazione dei processi apoptotici e stabilizzazione delle proteine (Rickauer *et al.*, 1989). La loro azione nei confronti dei fitofagi dipende dalla loro specificità per le proteasi dell'insetto e dalla

capacità di quest' ultimo di variare nel tempo i propri enzimi digestivi (Kessler A. and Baldwin 2002). L'induzione di *PinII* in seguito a masticazione con *S.littoralis*, è stata osservata dopo 4 ore dall'inizio dell'elicitazione, con un significativo incremento massimo a 24 ore, sia per le piante controllo che per le piante ANK. La presenza del gene *TnBVankI* amplifica l'induzione di *PinII*, in quanto nei transgeni sono registrati valori di RQ maggiori rispetto al controllo (RQ= 85 e RQ=30 rispettivamente). Una maggiore induzione del gene nei trasformanti è stata registrata anche nelle foglie distali. Tale risultato ci consente di affermare che il gene *TnBVankI*, influenza quantitativamente la risposta di alcuni geni in pianta.

In seguito all'osservazione dell'incremento dell'induzione di geni codificanti per inibitori di proteasi da parte del gene *TnBVankI* in presenza dell'insetto è stata avanzata l'ipotesi che le piante transgeniche fossero più tolleranti dei controlli all'attacco di larve di lepidotteri. Per verificare questa ipotesi, stati realizzati biosaggi con *Spodoptera littoralis*. E' stata osservata una diminuzione del tasso di sopravvivenza delle larve, che si alimentano con foglie transgeniche che è probabile conseguenza dell'incrementata induzione di geni codificanti per diverse classi di inibitori di proteasi (*PinI*, *PinII*, *KUNITZ* e *l'inibitore di carbossipeptidasi*), nelle linee transgeniche rispetto alla induzione che si registra nei controlli. Tuttavia, l'effetto insetticida osservato potrebbe essere la conseguenza della diretta attività biologica della proteina virale sulle larve di *Spodoptera* o ancora da metaboliti secondari conseguenza della regolazione differenziale di diversi geni coinvolti nel metabolismo. Un' ipotesi plausibile potrebbe essere che la proteina ricombinante ingerita dall' insetto, riesca ad oltrepassare la membrana peritrofica e traslocare nella cavità emocelica, dove può esplicare la sua funzione biologica analogamente a quanto osservato nelle larve parassitizzate. Una seconda ipotesi che potrebbe spiegare l'incremento della mortalità delle larve alimentate sulle foglie transgeniche, è che la proteina ricombinante in virtù dei domini anchirina (Al Khodor *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2009) abbia delle capacità agglutinanti lectino-simili, che interferiscono con l'assimilazione di nutrienti da parte dell'insetto (Michiels *et al.*, 2010). Analisi di immunolocalizzazione della proteina ricombinante in larve alimentate su piante transgeniche potranno verificare questa ipotesi. E' interessante osservare che, nel caso venisse verificata la presenza della proteina nella cavità emocelica di queste larve, l'uso di nuove combinazioni geniche, in grado di favorire il superamento della membrana peritrofica (Corrado *et al.*, 2008) e quindi il suo maggiore assorbimento intestinale, potrebbe incrementare l'attività insetticida osservata. Infatti, la membrana peritrofica

dell'insetto funge da setaccio molecolare (Hegedus *et al.*, 2009), in grado di bloccare il passaggio delle molecole tossiche ed evita il loro contatto con l'epitelio gastrico. L'impiego di piante esprimenti enzimi chitinolitici hanno mostrato nell'insetto un'alterazione della struttura della membrana peritrofica (Rao *et al.*, 2004; Corrado *et al.*, 2008), favorendo in questo modo l'assimilazione di molecole tossiche. Le chitinasi sono state associate con δ -endotossine, risultando tossiche per larve di *Spodoptera littoralis* che alimentate con una miscela costituita dalle due molecole hanno mostrato una riduzione del proprio peso (Regev *et al.*, 1996). Dunque, anche la proteina codificante del gene *TnBVank1* potrebbe essere combinata a proteine quali la chitinasi, potenziandone l'effetto tossico nei confronti di lepidotteri e quindi potrebbero essere ideati formulati da impiegare in agricoltura.

Un'altra parte del lavoro svolto durante questa attività di tesi, è stato incentrato su un'altra molecola di interesse, l'idrofobina Htr1. Lo studio delle interazioni antagoniste sviluppate tra le piante e i funghi appartenenti alla rizosfera sono considerate un'ottima fonte di geni e molecole di cui sfruttare le proprietà benefiche per le colture. Negli ultimi anni l'impiego di agenti di biocontrollo è divenuta una pratica alternativa ai metodi convenzionali che prevedono l'impiego di pesticidi chimici. Per tale motivo, oggi una notevole parte dei biopesticidi e biofertilizzanti sono costituiti da organismi simbiotici benefici, appartenenti al genere *Trichoderma* (Woo *et al.*, 2006). Essi sono noti per la loro capacità di produrre antibiotici (Vinale *et al.*, 2008; Rubio *et al.*, 2009) e/o enzimi idrolitici (Benitez *et al.*, 2004) che direttamente sono attivi nei confronti di funghi fitopatogeni. Alcuni ceppi sono noti per la loro capacità di promuovere in pianta la crescita e lo sviluppo incrementando così la resa produttiva (Harman *et al.*, 2004; Lorito *et al.*, 2010). Unitamente al ruolo di agente di biocontrollo, i funghi appartenenti al genere *Trichoderma* hanno un effetto benefico sulle colture in quanto stimolano le risposte di difesa promuovendo lo sviluppo radicale, la germinazione dei semi e migliorando la resistenza a stress abiotici (Shoresh *et al.*, 2010). È riportata in letteratura la capacità di tali funghi di innescare meccanismi di resistenza sistemica (Tucci *et al.*, 2010), che prevedono l'impiego di acido jasmonico (JA) o etilene (ET) attivando la resistenza sistemica indotta (ISR) oppure una resistenza sistemica acquisita (SAR) mediata dalla produzione di acido salicilico (SA) (Shoresh *et al.*, 2010; Mòran-Diez *et al.*, 2012). Il proteoma ed il trascrittoma della pianta cambia in seguito alle interazioni con i metaboliti prodotti dal fungo (Marra *et al.*, 2006) o la sua colonizzazione delle radici (Alfano *et al.*, 2007; Segarra *et al.*, 2007; Shoresh et al. 2010; Bae *et al.*, 2011); in questo modo il fungo riprogramma l'espressione genica

della pianta ospite, modificando le sue risposte in seguito a stimoli (Harman, 2011). E' stata attribuita al fungo la capacità di produrre differenti MAMPs quali enzimi, carboidrati, acidi grassi, metaboliti secondari e delle proteine non ancora ben caratterizzate che presentano domini di similarità con fattori di virulenza. Il coinvolgimento delle idrofobine nei processi di interazione tra il fungo e la pianta è stato riportato in letteratura da Viterbo e Chet (2006) che hanno dimostrato il coinvolgimento della idrofobina TasHyd1 nella colonizzazione delle radici di cetriolo in coltura idroponica da parte di *T.asperellum*. La sovraespressione di idrofobine è stata registrata anche in seguito a colonizzazione delle radici di pomodoro da parte di *Trichoderma*, inoltre durante le interazioni tra *T.virens* e radici di cetriolo è stato registrato l'incremento di una idrofobina chiamata Sm1 (Benitez *et al.*, 2004), tale proteina è risultata attivare risposte di difesa locali e sistemiche in pianta (Djonovic *et al.*, 2006).

Per meglio comprendere meccanismi che regolano l'interazione tra *Trichoderma*-pianta, si è focalizzata l'attenzione sulle idrofobine, in particolar modo l'idrofobina Htr1. Studi preliminari effettuati dal gruppo di ricerca della Dott.ssa Ruocco (dati non pubblicati) hanno rivelato che la proteina *in vitro* ha la capacità di inibire la sporulazione di *Botrytis cinerea* e *Rizoctonia solani*, attiva le difese endogene della pianta ed inoltre attiva risposte differenti (produzione di radici e talee, germinazione dei semi) strettamente correlate alla quantità di proteina utilizzata nei saggi. Per tale motivo il gene *Htr1* è stato inserito nel genoma di *Solanum lycopersicum* sotto il controllo di un promotore inducibile da etanolo (AlcR-AlcA) in grado di modulare l'espressione della proteina eterologa in pianta. Tale sistema proviene dal fungo *Aspergillus nidulans* e risulta essere uno dei più forti sistemi di espressione genica in funghi filamentosi, altamente inducibile è impiegato dal fungo per l'utilizzo di etanolo come unica fonte di carbonio (Flipphi *et al.*, 2002). Il sistema prevede due unità trascrizionali, la prima che attiva la trascrizione costitutiva di un cluster binucleare AlcR che solo in presenza di etanolo incrementa l'affinità per il promotore *pAlcA* (*Alcohol deidrogenasi*) attivando la trascrizione del gene di interesse e la sua espressione è paragonabile a quella del *CaMV35S* (Li *et al.*, 2005; Gatz and Lenk 1998). Le piante transgeniche ottenute sono state caratterizzate mediante un'analisi Southern e mediante RT-PCR. L'analisi ha rivelato sia linee a aventi singola inserzione del transgene che linee a copie multiple (variano da 2 a 5 copie). L'osservazione della parte aerea e radicale dei trasformanti, ha rivelato un fenotipo differente dal controllo, nella maggior parte delle piante molto marcato. La parte aerea presenta una minore altezza del fusto ed un incremento dei germogli laterali. L'apparato radicale invece, presenta radici meno folte

e più spesse. Purtroppo nelle condizioni sperimentali utilizzate, le piante transgeniche hanno mostrato espressione del transgene in assenza di induzione. Ciò non ha consentito di modulare l'espressione del gene come ci si era preposti di fare. La presenza del trascritto in pianta è stato confermato da un'analisi RT-PCR e la proteina è stata visualizzata mediante analisi Western Blot. La presenza di un profilo multibande rivelato dall'analisi Western Blot, ottenuto nonostante l'utilizzo di condizioni fortemente denaturanti, ha confermato l'elevato grado di idrofobicità delle proteine e la loro capacità di autoassemblarsi per formare multimeri (Wosten and De Voch, 2000; Wang *et al.*, 2005). Il primo segnale rivelato nella lastra ha una massa di 17 KDa e potrebbe essere attribuito ad un dimero, la cui singola unità corrisponde alla proteina senza il segnale di veicolamento. L'attivazione del sistema inducibile in assenza di induttore è stato riscontrato in piante di *Arabidopsis* esprimenti il gene GUS sotto il controllo di tale sistema; i trasformanti presentavano per il 13%, un'induzione genica nonostante l'assenza dell'induttore (Roslan *et al.*, 2001). Tale fenomeno può essere spiegato dalla capacità di tale sistema di attivare una trascrizione basale del gene di interesse, mentre in altri casi, la trascrizione è causata da uno stress radicale. E' nota in pianta la presenza di *alcohol deidrogenasi* (Dolferus *et al.*, 1994; Sachs *et al.*, 1980) e molto probabilmente le radici sono gli organi primari interessati da condizioni anaerobiche che causano una respirazione fermentativa il cui prodotto finale è l'etanolo che potrebbe accumularsi ed indurre il sistema anche in assenza di induttore. Studi precedenti effettuati su tabacco cresciuto in condizioni anaerobiche indotte artificialmente, ha rivelato che il sistema è attivato solo in severe condizioni di anaerobiosi (Salter *et al.*, 1998). E' possibile ipotizzare che il fenotipo osservato in pianta è causato dall'espressione della proteina che potrebbe interagire con alcuni pathway metabolici come ad esempio quello delle auxine, interferendo fortemente sulla crescita delle piante. Un'analisi Real-Time RT-PCR assoluta, è stata effettuata con lo scopo di identificare una correlazione tra la quantità di trascritto e il fenotipo osservato in piante allevate in vaso, impiegando linee risultate a singola copia alcune con un fenotipo più pronunciato, altre meno. L'analisi non ha rivelato una correlazione tra fenotipo e quantità di trascritto.

In conclusione, lo studio condotto ha dimostrato che la proteina TnBVank1 rappresenta un buon candidato per la protezione delle piante da lepidotteri dannosi. Sarà interessante valutare l'opportunità di utilizzare le piante di tabacco come *biofactory* della proteina da provare in condizioni di semi-campo per la validazione di quanto osservato.

Gli studi relativi alla proteina Htr1, hanno mostrato che essa ha un forte impatto sul fenotipo della pianta di pomodoro e che un suo possibile uso richiede un sistema di controllo della sua espressione.

6 BIBLIOGRAFIA

- Abramovitch R.B., Kim Y.J., Chen S., Dickman M.B. & Martin G.B. (2003). Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J.*, 22: 60–69
- AbuQamar S., Chai M.F., Luo H.L., Song F.M. and Mengiste, T. (2008). Tomato protein kinase 1b mediates signaling of plant responses to necrotrophic fungi and insect herbivory. *Plant Cell*; 20, 1964–1983.
- Adie B., Chico J.M., Rubio-Somoza I. and Solano R. (2007). Modulation of plant defenses by ethylene. *J. Plant GrowthRegul*, 26: 160–177
- Alfano G., Lewis Ivey M.L., Cakir C., Bos J.I. B., Miller S.A., Madden L.V, Kamoun S., and Hoitink H.A.J. (2007). Systemic Modulation of Gene Expression in Tomato by *Trichoderma hamatum*382. *Phytopathology*, 97(4):429-437
- Al-Khodori S., Price C.T., Kalia A., Abu Kwaik Y. (2010). Functional diversity of ankyrin repeats in microbial proteins. *Trends Microbiol*, 18: 132-139
- Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot*, 53(372):1331-41
- Anderson J.P., Badruzsaufari E., Schenk P.M., Manners J.M., Desmond O.J., Ehlert C., Maclean D.J., Ebert P.R. and Kazan K. (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *PlantCell*, 16: 3460–3479.
- Asselbergh B., Curvers K., Franca S.C., Audenaert K., Vuylsteke M., Van Breusegem F., Hofte M. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiol*, 144: 1863–1877
- Azarmi R., Hajieghrari B. and Giglou A. (2011). Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *African Journal of Biotechnology*, 10(31):5850-5855
- Bae H, Roberts D.P., Lim H.S., Strem M.D., Park S.C., Ryu C.M. (2011). Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *Mol Plant Microbe Interact*, 24:336–51
- Bari R., Jones J.D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol.Biol*, 69:473-488
- Beckage N.E., Gelman D.B. (2004). Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. *Annu Rev Entomol*, 49: 299-330

- Bellafore S., Shen Z.X., Rosso M.N., Abad P., Shih P., Briggs S.P. (2008). Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *PLoS Pathog*, 4(10):1-12
- Benitez T, Rincon A.M., Limon M.C., Codon A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol*, 7:249–60.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 62, 293-300.
- Bevan M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation, 26;12(22):8711-21.
- Bhuiyan N.H., Selvaraj G., Wei Y., King J. (2009). Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *J Exp Bot*, 60 (2): 509-521
- Birnboim e Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6):1513-23.
- Blatt M.R., Grabov A., Brearley J., Hammond-Kosack K., Jones J.D.G. (1999). K1 channels of Cf-9 transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9 elicitor-dependent signal transduction. *Plant J*, 19: 453–462
- Bonnet P., Bourdon E., Ponchet M., Blein J-P., Ricci P. (1996). Acquired resistance friggere by elicitors in tobacco and other plants. *Eur J Plant Pathol*, 102: 181–192
- Bozzo G.G., Kashchandra G. Raghothama and William C. Plaxton. (2002). Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *Eur. J. Biochem*, 269: 6278–6286
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254
- Budnik L.T. and Baur X. (2009). The assessment of environmental and occupational exposure to hazardous substances by biomonitoring. *Dtsch Arztebl. Int*, 106: 91–97
- Chen M.-S. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science*, 15: 101-114
- Chilton M.D., Currier T.C., Farrand S.K., Bendich A.J., Gordon M.P. and Nester E.W. (1974). *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71: 3672-3676.
- Chinchilla D., Bauer Z., Regenass M., Boller T., and Felix G. (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell*, 18: 1-12

- Chini A., Fonseca S., Fernandez G., Adie B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado G., Lopez-Vidriero I., Lozano F.M., Ponce M.R., Micol J.L. and Solano R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448: 666–671.
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124: 803–814
- Christeller J Liang W (2005). Plant serine protease inhibitors. *Protein and Peptide Letters*, 12: 439-447.
- Christensen A.B., Cho B.H., Næsby M., Gregersen P.L., Brandt J., Madriz-Ordeñana K., Collinge D.B., Thordal-Christensen H. (2003). The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology*, 3(3):135-44.
- Corrado G., Arciello S., Fanti P., Fiandra L., Garonna A., Digilio M.C., Lorito M., Giordana B., Pennacchio F., Rao R. (2008). The Chitinase A from the baculovirus AcMNPV enhances resistance to both fungi and herbivorous pests in tobacco. *Transgenic Res*, 17(4):557-71.
- Cosson P., Schurdi-Levraud V., Le QH, Sicard O., Caballero M., Roux F., Le Gall O., Candresse T., Revers F. (2012). The RTM resistance to potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: natural variation of the RTM genes and evidence for the implication of additional genes. *Plos One*; 7(6):1-10
- Cunnac S., Lindeberg M., Collmer A. (2009). *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Curr Opin in Microb*, 12: 53-60
- Debenest T., Silvestre J., Coste M. and Pinelli E. (2010) Effects of pesticides on freshwater diatoms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 203, 87–103
- Delaney T.P (2000). New mutants provide clues into regulation of systemic acquired resistance. *Trends Plant Sci*, 5(2): 49-51
- Del Sorbo G., Scala F., Parrella G., Lorito M., Comparini C., Ruocco M., and Scala A. (2000). Functional Expression of the Gene *cu*, Encoding the Phytotoxic Hydrophobin Cerato-ulmin, Enables *Ophiostoma quercus*, a Nonpathogen on Elm, to Cause Symptoms of Dutch Elm Disease. *MPMI* 13(1): 43–53
- Desveaux D., Després C., Joyeux A., Subramaniam R., Brisson N. (2000). PBF-2 Is a Novel Single-Stranded DNA Binding Factor Implicated in PR-10a Gene Activation in Potato. *The Plant Cell*, 12: 1477–1489
- Desveaux D., Singer A. U. & Dangl J. L. (2006). Type III effector proteins: doppelgangers of bacterial virulence. *Curr. Opin. Plant Biol*, 9, 376–382
- De Torres M., Mansfield J.W., Grabov N., Brown I.R., Ammoun H., Tsiamis G., Forsyth A., Robatzek S., Grant M., Boch J. (2006). *Pseudomonas syringae* effector AvrPtoB suppresses basal defence in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 47, 368–382

De Vos M., Van Oosten V.R., Van Poecke R.M., Van Pelt J.A., Pozo M.J., Mueller M.J., Buchala A.J., Métraux J.P., Van Loon L.C., Dicke M., Pieterse C.M. (2005). Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *Mol Plant Microbe Interact*, 18:923– 937.

Díez-Díaz M., Conejero V., Rodrigo I., Pearce G., Ryan C.A. (2004). Isolation and characterization of wound-inducible carboxypeptidase inhibitor from tomato leaves, 65(13):1919-24.

Dixon D.C., Cutt J.R., Klessig D.F. (1991). Differential targeting of the tobacco PR-1 pathogenesis-related proteins to the extracellular space and vacuoles of crystal idioblasts. *EMBO J*, 10: 1317-1324

Djonović S., Pozo M.J., Dangott L.J., Howell C.R., Kenerley C.M. (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interact*, 19(8):838-53

Dolferus R., Jacobs M., Peacock W.J. and Dennis E.S. (1994). Differential interactions of promoter elements in stress responses of Arabidopsis *Adh* gene. *Plant. Physiol.* 105: 1075±1087.

Dong X. (2004). The role of membrane-bound ankyrin-repeat protein ACD6 in programmed cell death and plant defense. *Sci STKE*, (221): 1-6.

Dorak T. (2006). Real-time PCR . Edited by Taylor and Francis Group

Duchi S., Cavaliere V., Fagnocchi L., Grimaldi M.R., Falabella P., Graziani F., Gigliotti S., Pennacchio F., Gargiulo G. (2010). The impact on microtubule network of a bracovirus IkappaB-like protein. *Cellular and molecular life Science*; 67(10):1699-712

Dunaevsky Ya. E., Elpidina E. N., Vinokurov K. S. and Belozersky M. A. (2005). Protease Inhibitors in Improvement of Plant Resistance to Pathogens and Insects. *Molecular Biology*, 39, (4): 608–613.

Durrant W.E., Dong X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*, 42:185-209.

Elad Y. and Kapat A. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 177–189

Engelberth J., Alborn H.T., Schmelz E.A., Tumlinson J.H., (2004). Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101: 1781-85.

Falabella P., Varricchio P., Gigliotti S., Tranfaglia A., Pennacchio F., Malva C. (2003). *Toxoneuron nigriceps* polydnavirus encodes a putative aspartyl protease highly expressed in parasitized host larvae. *Insect Molecular Biology*, 12(1): 9-17.

Falabella P., Varricchio P., Provost B., Espagne E., Ferrarese R., Grimaldi A., De Eguileor M., Fiminai G., Urini M.V., Malva C., Drezen J.M., Pennacchio F. (2007). Bracoviruses contain a multigene family coding for I κ B-like proteins. *J Gen Virol*, 88: 92-104

Felix G. e Boller T. (2003). Molecular sensing of bacteria in plants The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J Biol Chem*, 278: 6201–6208

Felton G.W., Gatehouse J.A. (1996). Antinutritive plant defence mechanisms. *Biology of the insect midgut*. London: Chapman & Hall, 373-416.

Ferry N., Edwards M.G., Gatehouse J.A. and Gatehouse A.M.R. (2004) Plant–insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, 15:155–161

Ferry N., Edwards M.G., Gatehouse J., Capell T., Christou P., Gatehouse A.M.R. (2006). Transgenic Plants for Insect Pest Control: A Forward Looking Scientific Perspective. *Transgenic res*, 15: 13-19

Flipphi M., Kocalkowska J., Felenbok B.(2002). Characteristics of physiological inducers of the ethanol utilization (alc) pathway in *Aspergillus nidulans*. *Biochem J*; 15;364:25-31.

Forrest, K. L., Bhawe M. (2010). Physical mapping of wheat aquaporin genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 120 (4): 863-873

Fulton T.M., Chunwongse J., e Tanksley S.D. (1995). Microprep Protocol for Extraction of DNA from Tomato and other Herbaceous Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13: 207-209.

Gatz and Lenk I. (1998). Promoters that respond to chemical inducers. *Elsevier Science*, 3: 352-358

Ghosh S. e Karin M. (2002). Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell*, 109: 81-96

Ghosh S., May M.J., Kopp E.B. (1998). NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 16: 225-60

Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*; 43:205-27

Goossens A., Häkkinen S.T., Laakso I., Seppänen-Laakso T., Biondi S., De Sutter V., Lammertyn F., Nuutila A.M., Söderlund H., Zabeau M., Inzé D., Oksman-Caldentey K.M. 2003. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*;100(14):8595-600

Gozzo F. (2003). Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *J Agric Food Chem*, 51(16):4487-503.

- Graham, J.S. And Ryan C.A. (1997). Accumulation Of Metalloprotease Inhibitor In Leaves Of Wounded Potato Plants. *Biochemical And Biophysics Research Communication*, 101:1164-1170
- Green R.T., Ryan C.A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*, 175: 776-777
- Guilley H., Dudley R.K., Jonard G., Balazs E., Richards K. B. (1982). Transcription of cauliflower mosaic virus DNA; detection of promoter sequences and characterization of transcripts. *Cell*, 30:763-773
- Guo D., Chen F., Inoue K., Blount J.W., Dixon R.A. (2001). Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa. impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *Plant Cell*, 13(1): 73-88
- Habib H., Fazili K.M. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology review*. 2(3): 68-85.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I. & Lorito M. (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 43-56
- Harman GE. (2011). Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytol*, 189:647–9.
- Havkioja E. And Neuvonen L. (1985). Induced Long-Term Resistance To Birch Foliage Against Defoliators :Defense Or Incidental.Ecology, 66: 1303-1308.
- Heese A., Ludwig A.A. and Jones J.D.G. (2005). Rapid Phosphorylation of a Syntaxin during the Avr9/Cf-9-Race-Specific Signaling Pathway. *Plant physiology*, 138(4):2406-2416
- Hegedus D., Erlandson M., Gillott C., Toprak U. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu Rev Entomol*, 54: 285-302
- Hektor H.J. and Scholtmeijer K. (2005). Hydrophobins: proteins with potential. *Current Opinion in Biotechnology*, 16:434–439
- Hématy K., Cherk C., Somerville S. (2009). Host–pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol*, 12: 406-413
- Hepler P.K., Valster A., Molchan T., Vos J.W. 2002. Roles for kinesin and myosin during cytokinesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 29;357(1422):761-6.
- Hilpert K., Hansen G., Wessner H., Küttner G., Welfle K., Seifert M. and Höhne W. 2001. Anti c-myc antibody 9E10: epitope key position and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose. *Protein engineering*, 14, (10):803-806

- Hoekema A., Hirsch P. R., Hooykaas P. J. J. & Schilperoort R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303, 179-180
- Hoffmann J. A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426: 33-38
- Hoffmann J.A. e Reichhart J.M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunol*, 3: 121-126.
- Hollander-Czytko H., Andersen J.K., And Ryan C.A. (1985). Vacuolar Localization Of Wound-Induced Carboxy Peptidase Inhibitor In Potato Leaves. *Plant Physiology*, 78: 76-79
- Huang H., Lin M., Wang X., Kikuchi T., Mottaz H., Norbeck A., Rikihisa Y. (2008). Proteomic analysis of and immune responses to *Ehrlichia chaffeensis* lipoproteins. *Infect. Immun.* 76, 3405–3414
- Huang J., Zhao X., Yu H., Ouyang Y., Wang L., Zhang Q. (2009). The ankyrin repeat gene family in rice: genome-wide identification, classification and expression profiling. *Plant Mol Biol*, 71(3): 207-26
- Hulbert S.H., Webb C.A., Smith S.M., Sun Q. (2001). Resistance gene complexes: Evolution and Utilization. *Annu Rev Phytopathol*, 39: 285–312
- Jones DA, Jones JDG. (1997) The role of leucinerich repeat proteins in plant defenses. *Adv Bot Res*, 24:89– 167.
- Jones J.D, Dangl J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444: 323-9
- Kaida R., Serada S., Norioka N., Norioka S., Neumetzler L., Pauly M., Sampedro J., Zarra I., Hayashi T., and Kaneko T. S. (2010). Potential Role for Purple Acid Phosphatase in the Dephosphorylation of Wall Proteins in Tobacco Cell. *Plant Physiology*, 153: 603–610
- Kaminaka H., Nake C., Eppe P., Dittgen J., Schutze K., Chaban C., Holt III B.F., Merkle T., Schafer E., Harter K., Dangl J.L. (2006). bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in *Arabidopsis* following infection. *EMBO J*, 25: 4400–441
- Karin M. e Ben-Neriah Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NFkB activity. *Annu Rev Immunol*, 18: 621–663
- Kazan K., and Manners J.M. (2008). Jasmonate signaling: toward an integrated view. *PlantPhysiol.* 146, 1459–1468.
- Keller H., Blein J.P., Bonnet P., Ricci P. (1996). Physiological and Molecular Characteristics of Elicitin-Induced Systemic Acquired Resistance in Tobacco. *Plant Physiology*, 110(2):365-376.
- Kennelly P.J. and Krebs E.G. (1991). Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem*, 266(24):15555-15558.

- Kershaw M.J. and Talbot N.J. (1998). Hydrophobins and Repellents: Proteins with Fundamental Roles in Fungal Morphogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, 23: 18–33
- Kessler A., Baldwin I.T. (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 299-328.
- Kessler A., Halitschke R., Diezel C., Baldwin I.T. (2006). Priming of plant defense responses in nature by airborne signalling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuata*. *Oecologia*, 148: 280-92.
- Kim S., Ahn I.P., Rho H.S. and Lee Y.H. (2005). MHP1, a *Magnaporthe grisea* hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization. *Molecular Microbiology*, 57 (5):1224–1237
- Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., Shimamoto K., Doke N., Yoshioka H. (2007). Calcium-Dependent Protein Kinases Regulate the Production of Reactive Oxygen Species by Potato NADPH Oxidase. *Plant Cell*, 19(3): 1065–1080
- Koiwa H., Bressan R.A., Hasegawa P.M. (1997). Regulation of proteinase inhibitor and plant defence. *10-2:379-384*
- Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G., Sheen J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 2940–2945
- Kuhlmann M., Horvay K., Strathmann A., Heinekamp T., Fischer U., Böttner S., Dröge-Laser W. (2003). The a-Helical D1 Domain of the tobacco bZIP transcription factor BZI-1 interacts with the ankyrin-repeat protein ANK1 and is important for BZI-1 function, both in auxin signaling and pathogen response. *J Biol Chem*, 278(10): 8786-94
- Lackman P., González-Guzmán M., Tilleman S., Carqueijeiro I., Pérez A.C., Moses T., Seo M., Kanno Y., Häkkinen S.T., Van Montagu M.C., Thevelein J.M., Maaheimo H., Oksman-Caldentey K.M., Rodriguez P.L., Rischer H., Goossens A. (2011). Jasmonate signaling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in *Arabidopsis* and tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;108(14):5891-6
- Li L., Zhao Y.F., McCaig B.C., Wingerd B.A., Wang J.H., Whalon M.E., Pichersky E. and Howe G.A. (2004) The tomato homolog of CORONATINEINSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell*; 16, 126–143. Erratum in *Plant Cell*, 2004, 16, 783.
- Linder M.B., Szilvay G.R., Nakari-Setälä T., Merja E. Penttilä. (2005). Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *Microbiology Reviews*, 29: 877–896
- Linke K., Wolfram T, Bussemer J., Jakob U. (2003). The roles of the two zinc binding sites in DnaJ. *Journal of Biological chemistry*, 278(45):44457-66
- Li R., Jia X., Mao X. (2005). Ethanol-inducible gene expression system and its applications in plant functional genomics. *Plant science*, 169 (3): 463–469

- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-408
- Lloyd A.J., Allwood J., Winder C.L., Dunn W.B., Heald J.K., Cristescu S.M., Sivakumaran A., Harren F.J.M., Mulema J., Denby K., Goodacre R., Smith A.R. Mur L.A.J. (2011). Metabolomic approaches reveal that cell wall modifications play a major role in ethylene-mediated resistance against *Botrytis cinerea*. *Plant J*, 67: 852–868
- Lorenzo O., Chico J.M., Sánchez-Serrano J.J., Solano R. (2004) Jasmonate-Insensitive1 Encodes A Myc transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*, 16(7):1938-50
- Lorito M, Woo SL, Harman GE, Monte E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. *Annu Rev Phytopathol*, 48:395–418.
- Maiti I.B., Dey N., Pattanaik S., Dahlman D.L., Rana R.L., Webb B.A. (2003). Antibiosis-type insect resistance in transgenic plants expressing a teratocyte secretory protein (TSP14) gene from a hymenopteran endoparasite (*Microplitis croceipes*). *Plant Biotechnology Journal*, (3):209-19.
- Malek S., Huang D., Huxford T., Ghosh S. and Ghosh G. (2003). X-ray Crystal Structure of an IκB/NF-κB p65 Homodimer Complex. *Journal of biological chemistry*, 278: 23094–23100.
- Malva C., Varricchio P., Falabella P., La Scaleia R., Graziani F., Pennacchio F. (2004). Physiological and molecular interaction in the host-parasitoid system *Heliothis virescens*-*Toxoneuron nigriceps*: current status and future perspectives. *Insect Biochem Mol Biol*, 34(2): 177-83
- Marita J.M., Ralph J., Hatfield R.D., Guo D., Chen F., Dixon R.A. (2003). Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase. *Phytochemistry*., 62(1):53-65.
- Marra R, Ambrosino P., Carbone V., Vinale F., Woo S.L., Ruocco M., Ciliento R., Lanzuise S., Ferraioli S., Soriente I., Gigante S., Turrà D., Fogliano V., Scala F., Lorito M. (2006). Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Curr Genet*, 50:307–21.
- McGurl B., Orozco-Cardenas M., Pearce G., Ryan C.A. (1994). Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91,9799-9802.
- Melchers LS, Stuiver MH. (2000). Novel genes for disease-resistance breeding. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(2):147-52.

- Mellersh D. G. and Heath M. C. (2001). Plasma Membrane –Cell Wall Adhesion Is Required for Expression of Plant Defense Responses during Fungal Penetration. *Plant Cell*, 13(2): 413–424
- Melotto M., Underwood W., He S.Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu Rev Phytopathol*, 46:101-22.
- Melotto M., Underwood W., Koczan J., Nomura K. & He S. (2006). The innate immune function of plant stomata against bacterial invasion. *Cell*, 126, 969–980
- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot*, 61(15):4197-220
- Michiels K., Van Damme E.J., Smagghe G. (2010). Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins? *Arch Insect Biochem Physiol*, 73(4):193-212
- Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 58: 459-481
- Morán-Diez E, Rubio B, Domínguez S, Hermosa R, Monte E, Nicolás C. (2012). Transcriptomic response of Arabidopsis thaliana after 24h incubation with the biocontrol fungus Trichoderma harzianum. *J Plant Physiol*, 15;169(6):614-20
- Mosavi L.K., Cammett T.J., Desrosiers D.C. and Peng Z.Y. (2004). The Ankyrin Repeat as Molecular Architecture for Protein Recognition. *Protein Science*, 13: 1435–1448.
- Müller O., Schreier P.H., Uhrig J.F.(2008). Identification and characterization of secreted and pathogenesis-related proteins in Ustilago maydis. *Mol Genet Genomics*, 279:27–39
- Naoumkina M.A., Zhao Q., Gallego-Giraldo L., Dai X., Zhao P.X., Dixon R.A. (2010). Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Mol Plant Pathol*, 11(6):829-46.
- Nelson C., Ryan, C.A. (1980) In vitro synthesis of pre-proteins of two vacuolar compartmented proteinase inhibitors that accumulate in leaves of wounded tomato plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A*, 77: 1975–1979
- Nicholson R.L., Hammerschmidt R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev Phytopathol*, 30: 369–389
- Nürnberger T., Brunner F., Kemmerling B., Piater L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immun Rev*, 198: 249-266
- Oerke E.C., Dehne H.W., Schohobeck F. and Weber A. (1995). Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops. Elsevier, Amsterdam.
- Oldroyd GE, Long SR. (2003). Identification and characterization of nodulation-signaling pathway 2, a gene of Medicago truncatula involved in Nod factor signaling. *Plant Physiol*, 131(3):1027-32.

- Padmanabhan M., Cournoyer P., Dinesh-Kumar S.P. (2009). The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: a wealth of possibilities. *Cell Microbiol*, 11(2):191-8.
- Palek J. e Lambert S. (1990). Genetics of the red cell membrane skeleton. *Semin Hematol*, 27: 290-332
- Park S.-W., Kaimoyo E., Kumar D., Mosher S., Klessig, D.F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318: 113–116
- Park S.-W., Liu P.-P, Forouhar F., Vlot A.C., Tong L., Tietjen K., Klessig D.F. (2009). Use of a synthetic salicylic acid analog to investigate the roles of methyl salicylate and its esterases in plant disease resistance. *J Biol Chem*, 284: 7307–7317
- Paschold A., Halitschke R., Baldwin I.T. (2007) Co(i)-ordinating defenses: NaCOI1 mediates herbivore-induced resistance in *Nicotiana attenuata* and reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses. *Plant J*, 51:79–91
- Peñaflor M.F.G.V., Erb M., Miranda L.A., Werneburg A.G., Bento J.M.S. (2011). Herbivore-Induced Plant Volatiles Can Serve as Host Location Cues for a Generalist and a Specialist Egg Parasitoid. *Journal of Chemical Ecology*, 37 (12): 1304-1313
- Pennacchio F. e Strand M.R. (2006). Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annu Rev Entomol*, 51: 233-58
- Pennacchio F., Vinson S.B., Tremblay E. (1993). Growth and development of *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera, Braconidae) larvae and their synchronization with some changes of the hemolymph composition of their host, *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera, Noctuidae). *Arch Insect Biochem Physiol*, 24: 65–77
- Penninckx I.A., Thomma B.P., Buchala A., Métraux J.-P., and Broekaert W.F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *PlantCell*, 10, 2103–2113
- Piedras P., Hammond-Kosack K.E., Harrison K., Jones J.D.G. (1998) Rapid, Cf-9- and Avr9-dependent production of active oxygen species in tobacco suspension cultures. *Mol Plant Microbe Interact*, 11: 1155–1166
- Pieterse C.M.J., Van Loon L.C. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, 7(4): 456-464.
- Pokalsky A.R., Hiatt W.R., Ridge N., Rasmussen R., Houck C.M., Shewmaker C.K. (1989). Structure and expression of elongation factor 1 alpha in tomato. *Nucleic Acids Res* 17, 4661-4673.
- Ponstein A.S., Bres-Vloemans S.A., Sela-Buurlage M.B., van den Elzen P.J., Melchers L.S., Cornelissen B.J. (1994). A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. *Plant Physiol*, 104(1):109-18.

- Raiola A., Lionetti V., Elmaghraby I., Immerzeel P., Mellerowicz E.J., Salvi G., Cervone F., Bellincampi D. (2010). Pectin methylesterase is induced in *Arabidopsis* upon infection and is necessary for a successful colonization by necrotrophic pathogens, 24(4):432-40.
- Rao R., Fiandra L., Giordana B., de Eguileor M., Congiu T., Burlini N., Arciello S., Corrado G., Pennacchio F. (2004). AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. *Insect Biochem Mol Biol*, 34(11): 1205-13
- Regev A., Keller M., Strizhov N., Sneh B., Prudovsky E., Chet I., Ginzberg I., Konez C., Schell J., Zilberstein A. (1996). Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl Environ Microbial*, 62: 3581-86
- Reymond P., Bodenhausen N., Van Poecke R.M., Krishnamurthy V., Dicke M., Farmer E.E. (2004). A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell*, 16:3132–3147.
- Ricci P., Bonnet P., Huet J.-C., Sallantin M., Beauvais-Cante F., Bruneteau M., Billard V., Michel G. And Pernollet J.-C. (1989). Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco; *European Journal. Biochemistry*, 183: 555 - 563
- Rickauer M., Fournier J., Esquerré-Tugayé M.T. (1989). Induction of proteinase inhibitors in tobacco cell suspension culture by elicitors of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Plant Physiol*, 90: 1065-1070
- Rivière M.P., Marais A., Ponchet M., Willats W. and Galiana E. (2008). Silencing of acidic pathogenesis-related *PR-1* genes increases extracellular β -(1→3)-glucanase activity at the onset of tobacco defence reactions . *Journal of Experimental Botany*, 59(6):1225-1239
- Romeis T., Piedras P., Zhang S.Q., Klessig D.F., Hirt H., Jones J.D.G. (1999) Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell*, 11: 273–287
- Romeis T, Piedras P, Jones J.D.G. (2000). Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell*. 12: 803–815
- Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones J.D.G. (2001). Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defense response. *EMBO J*. 20: 5556–5567
- Roslan H.A., Salter M.G., Wood C.D., White M.R.H., Croft K.P., Robson F., Coupland G., Doonan J., Laufs P., Tomsett A.B. and Caddick M.X. (2001). Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 28(2): 225-235

- Rowland O., Ludwig A.A., Merrick C.J., Baillieul F., Tracy F.E., Durrant W.E., Fritz-Laylin L., Nekrasov V., Ilander K. S., Yoshioka H., Jones J. D.G. (2005). Functional analysis of Avr9/Cf-9 rapidly elicited genes identifies a Protein Kinase, ACIK1, that is essential for full Cf-9-dependent disease resistance in tomato the plant cell; 17: 295–
- Rubio M.B., Hermosa R., Reino J.L., Collado I.G., Monte E. (2009). Thctf1 transcription factor of *Trichoderma harzianum* is involved in 6-pentyl-2H-pyran-2-one production and antifungal activity. *Fungal Genet Biol*, 46:17–27.
- Rushton D.L., Tripathi P., Rabara R.C., Lin J., Ringler P., Boken A.K., Langum T.J., Smidt L., Boomsma D.D., Emme N.J., Chen X., Finer J.J., Shen Q.J., Rushton P.J. (2010). WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. *Plant Biotechnol J*, 10(1):2-11
- Ryan C.A. (2000). The systemin signalling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure et Molecular Enzymologia*, 1477,112-121.
- Sachs M.M., Freeling M. and Okimoto R. (1980) The anaerobic proteins of maize. *Cell*, 20, 761±767.
- Salter M.G., Paine J.A., Riddell K.V., Jepson I., Greenland A.J., Caddick M.X. and Tomsett, A.B. (1998) Characterisation of the ethanol-inducible alc gene expression system for transgenic plants. *Plant J*, 16: 127±132.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Savitch L.V., Subramaniam R., Allard G.C., Singh J. (2007). The GLK1 ‘regulon’ encodes disease defense related proteins and confers resistance to *Fusarium graminearum* in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2: 234–238
- Schittko U, Hermsmeier D, Baldwin IT: Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. II. Accumulation of plant mRNAs in response to insect-derived cues. *Plant Physiol* 2001, 125:701-710.
- Schulze B., Mentzel T., Jehle A.K., Mueller K., Beeler S., Boller T., Felix G., Chinchilla D. (2010). Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J Biol Chem*, 285(13):9444-51
- Sedgwick S.G. and Smerdon S.J. (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci*, 24: 311–16
- Segarra G., Casanova E., Bellido D., Odena M.A., Oliveira E., Trillas I. (2007). Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics*, 7:3943–52.

Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K. (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J*, 31: 279–29

Seidl-Seiboth V., Gruber S., Sezerman U., Schwecke T, Albayrak A., Neuhof T., von Dohren H., Baker S.E, Kubicek C.P. (2011). Novel Hydrophobins from *Trichoderma* Define a New Hydrophobin Subclass: Protein Properties, Evolution, Regulation and Processing. *J Mol Evol*, 72:339–351

Seung H.C. & Gary W. Felton.(2011). Specificity of Induced Resistance in Tomato Against Specialist Lepidopteran and Coleopteran Species. *J Chem Ecol*, 37:378–386

Sheard L.B., Tan X., Mao H.B., Withers J., Ben-Nissan G., Hinds T.R., Kobayashi Y., Hsu F.-F., Sharon M., Browse J., He S.Y., Rizo J., Howe G. A., and Zheng N. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, 468: 400–405.

Shen BZ, Zheng ZW, Dooner HK 2000 A maize sesquiterpene cyclase gene induced by insect herbivory and volicitin: characterization of wild-type and mutant alleles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:14807-14812.

Shen G., Kuppu S., Venkataramani S., Wang J., Yan J., Qiu X., et al. (2010). The Arabidopsis ankyrin repeat-containing protein 2A is an essential molecular chaperone for peroxisomal membrane-bound ascorbate peroxidase 3 in Arabidopsis. *Plant Cell*, 22: 811–831

Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol*, 3: 217–223.

Shoresh M, Harman GE, Mastouri F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol*, 48:21–43.

Singh S., Cornilescu C.C., Tyler R.C., Cornilescu G., Tonelli M., Lee M.S., Markley J.L. (2005). Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from Arabidopsis thaliana, a cellular stress-related protein. *Protein Sci*, 14(10):2601-9

Spartz A.K., Lee S. H., Wenger J. P., Gonzalez N., Itoh H., Inzé D., Peer W. A., Murphy A. S., Overvoorde P. J, and Gray W. M. (2012) The *SAUR19* subfamily of *SMALL AUXIN UP RNA* genes promote cell expansion. *Plant Journal*, 70(6):978-990

Staswick, P.E., and Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell*, 16, 2117–2127

Sun S.C., Ganchi P.A., Ballard D.W., Greene W.C. (1993). NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B α : evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259:1912-15.

- Sun W., Bernard C., Van de Cotte C., Van Montagu M. and Verbruggen N. (2001). At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon overexpression. *The Plant Journal*, 27(5): 407-415
- Sunde M., Kwan A. H.Y., Templeton M.D., Ross E. Beever, Mackay J.P. (2008). Structural analysis of hydrophobins. *Micron*, 39, 773–784
- Tada Y., Spoel S. H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. (2008). Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science* 321 (5891): 952-956
- Thines B., Katsir L., Melotto M., Niu Y., Mandaokar A., Liu G.H., Nomura K., He S.Y., Howe G.A. and Browse J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF-COI1 complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448, 661–665
- Thoetkiattikul H., Beck M.H., Strand M.R. (2005). Inhibitor IκB-like proteins from a polydnavirus inhibit NF-κB activation and suppress the insect immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 11426-31
- Tremblay E, (1999). *Entomologia applicata*. Liguori Editore (Napoli).
- Tucci M., Ruocco M., De Masi L., De Palma M. And Lorito M. (2011). The Beneficial Effect Of *Trichoderma* Spp. On Tomato Is Modulated By The Plant Genotype. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 341–354
- Uppalapati R.S., Ishiga Y., Wangdi T., Kunkel B. N., Anand A., Mysore K. S., Bender C. L. 2007. The Phytotoxin Coronatine Contributes to Pathogen Fitness and Is Required for Suppression of Salicylic Acid Accumulation in Tomato Inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *MPMI*, 20(8): 955-965.
- Vanacker H., Carver T.L., Foyer C.H. 1998. Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiol*, 117(3):1103-14.
- Vancanneyt G., Sanz C., Farmaki T., Paneque M., Ortego F., Castanera P., Sanchez Serrano J.J. (2001) Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:8139-8144.
- Van der Ent S., Verhagen B.W., Van Doorn R., Bakker D., Verlaan M.G., Pel M.J., Joosten R.G., Proveniers M.C., Van Loon L.C., Ton J., Pieterse C.M. 2008. MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.*;146(3):1293-304
- Van Wees S.C., Van der Ent S., Pieterse C.M. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol.*;11(4):443-8.
- Varricchio P., Falabella P., Sordetti R., Graziani F., Malva C., Pennacchio F. (1999). *Cardiochiles nigricaps* polydnavirus: molecular characterization and gene expression in parasitized *Heliothis virescens* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 1087-1096

- Verhage A., Vlaardingerbroek I., Raaymakers C., Van Dam N.M., Dicke M., Saskia C.M. Van Wees and Pieterse C.M.J. (2011). Rewiring of the jasmonate signaling pathway in *Arabidopsis* during insect herbivory. *Frontiers Plant Science*, 2 (47):1-12
- Verhagen B.W., Glazebrook J., Zhu T., Chang H.S., van Loon L.C., Pieterse C.M. (2004). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 17(8):895-908.
- Vinale F., Sivasithamparan K., Ghisalberti E.L., Marra R., Woo S.L., Lorito M. (2008). *Trichoderma* plant-pathogen interactions. *Soil Biol Biochem*, 40:1–10.
- Viterbo A., Chet I. (2006). Tashyd1 a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Molecular Plant Pathology*, 7(4), 249–258
- Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F. (2009). Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol*, 47:177-206.
- Vlot A.C., Klessig D.F., Park S.W. (2008). Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*, 11 (4): 436-442
- Voronin D.A., Kiseleva E.V. (2007). Functional role of proteins containing ankyrin repeats. *Cell and tissue Biology*, 49(12):989-99.
- Walling L.L. 2009. Adaptive defense response to pathogens and insect. Elsevier
- Wang Z., Lienemann M., Qiao M., and Linder M. B. 2010. Mechanisms of Protein Adhesion on Surface Films of Hydrophobin. *Langmuir*, 26(11),8491–8496
- Wang X., Shi F., Wösten H.A., Hektor H., Poolman B., Robillard G.T. (2005). The SC3 hydrophobin self-assembles into a membrane with distinct mass transfer properties. *Biophys J*, 88(5):3434-43
- Webb B.A. (1998). Polydnavirus biology, genome structure, and evolution. In *The Insect Viruses*, ed. LK Miller, LA Balls, New York: Plenum, pp. 105-39
- Wei L., Li Y. (2009). Distribution of an ankyrin-repeat protein on the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*, 51(2):140-6
- Whiteford J.R., Spanu P.D. (2002). Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *molecular plant pathology*, 3 (5),391–400
- Woo S.L. and Lorito M. (2007). Exploiting The Interactions Between Fungal Antagonists, Pathogens And The Plant For Biocontrol. *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, 107-130
- Woo S.L., Scala F., Ruocco M. and Lorito M. (2006) The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96, 181–185.

Wosten H.A.B. (2001). Hydrophobins: Multipurpose Proteins. *Annu. Rev. Microbiol*, 55:625–46

Wösten H.A., de Vocht M.L. (2000). Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim Biophys Acta*, 18;1469(2):79-86.

Zarate S.I., Kempema L.A., Walling L.L. (2007). Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiol*, 143:866–875.

Zhang X.L., Penfold J., Thomas R.K., Tucker I.M., Petkov J.T., Bent J., Cox A. and Grillo I. (2011). Self-Assembly of Hydrophobin and Hydrophobin/Surfactant Mixtures in Aqueous Solution. *Langmuir*, 27:10514–10522

Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J.D.G., Boller T., Felix G. (2006). Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Cell*, 125(4): 749-760

Zipfel C. & Felix G. (2005). Plants and animals: a different taste for microbes?. *Current Opinion in Plant Biology*. 8, 353–360

Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E.J., Jones J.D., Felix G. and Boller T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428: 764–767

Yan J., Zhang C., Gu M., Bai Z., Zhang W., Qi T., Cheng Z., Peng W., Luo H., Nan, F., Wang Z., Andxie D. (2009). The *Arabidopsis* coronatine insensitive 1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell*, 21, 2220–2236.

Yan J., Wang J., Zhang H. (2002). An ankyrin repeat-containing protein plays a role in both disease resistance and antioxidation metabolism. *Plant J*, 29:193–202

Yedidia I., Benhamou N., Kapulnik Y., Chet I. (2000). Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiology Biochemistry*, 38: 863–873

Yi S.Y., Yu S.H., Choi D. (2003). Involvement of hydrogen peroxide in repression of catalase in TMV-infected resistant tobacco. *Mol Cells*, 15(3):364-9.

7 APPENDICE

Tabella A7: Geni overespressi con *Fold Change* superiore a 2 nelle piante ANK e controllo, trattati con capsiceina; **AGI:** Gene Index Accession number; **TC:** Tentative consensus; **FC:** fold change

TC	FC	Geni
Risposte a stimoli		
TC129018	4,35	Pathogenesis-related protein 1
TC145668	3,73	Pathogenesis-related protein 1A precursor
TC122999	2,96	beta- -glucanase
TC133403	2,85	cytoplasmic aconitate hydratase
TC131341	2,56	metallocarboxypeptidase inhibitor precursor
TC152204	2,25	proteinase inhibitor i
TC123149	2,15	osmotin-like protein
TC136138	2,13	pathogenesis-related protein 4b
TC127148	2,12	mlp-like protein 28
TC124941	2,11	kunitz-like protease partial
TC134566	2,01	DnaJ homolog
Org. dei componenti cellulari o biogenesi		
TC161292	2,78	dag protein
Processo cellulare		
TC127119	2,01	quinone oxidoreductase-like protein 2 homolog
Regolazione biologica		
TC134506	2,99	14 kda proline-rich protein
TC126478	2,63	auxin:hydrogen
Non caratterizzate		
TC145523	2,02	---NA---

Tabella A8: Geni downregolati con *Fold Change* inferiore a 0.5 nelle piante ANK e controllo, trattati con capsiceina; **AGI:** Gene Index Accession number; **TC:** Tentative consensus; **FC:** fold change

TC	FC	Geni
<i>Risposte a stimoli</i>		
TC140401	0,48	myo-inositol 1-phosphate synthase
TC156186	0,48	late embryogenesis-abundant protein
TC133694	0,44	ras-related protein rabe1c-like
TC136419	0,43	purple acid phosphatase
TC133680	0,41	trypsin proteinase inhibitor precursor
TC141243	0,40	patatin-like protein
TC145585	0,40	peptidase m16 family protein
TC124550	0,38	abscisic acid receptor pyl4-like
TC126488	0,34	nad h dehydrogenase 18
TC133198	0,33	nac domain protein
TC140905	0,30	rtm1 protein
TC128086	0,28	lsd1-like protein
TC146386	0,26	protease inhibitor ii
TC151964	0,20	2-oxoglutarate and fe -dependent oxygenase-like protein
<i>Trasduzione del segnale</i>		
TC133694	0,44	ras-related protein rabe1c-like
TC136478	0,43	protein kinase-like protein
<i>Processi metabolici</i>		
TC122961	0,49	enoyl-acp reductase
TC132915	0,49	ubiquitin-associated ts-n domain-containing protein
TC131826	0,49	fasciclin-like arabinogalactan protein 14-like
TC150554	0,46	lysosomal beta glucosidase-like
TC123389	0,46	5 -adenylylsulfate reductase-like 5-like
TC122911	0,46	polygalacturonase
TC123028	0,46	chalcone isomerase
TC123122	0,44	caffeic acid 3-o-methyltransferase
TC132706	0,42	coatomer subunit beta -2-like
TC133911	0,40	proteasome maturation factor ump1 family protein
TC131325	0,38	endoglucanase 11-like
TC125907	0,37	probable beta- -galactosyltransferase 11-like
TC137930	0,35	glyoxalase i

TC	FC	Geni
TC168543	0,28	at1g67140
<i>Processo cellulare</i>		
TC124296	0,45	tumor-related protein
TC132971	0,42	zinc finger ccch domain-containing protein
TC130397	0,35	tpx2 (targeting protein for xklp2) protein family
TC126106	0,29	protein red-like
<i>Org. dei componenti cellulari o biogenesi</i>		
TC123299	0,43	120 kda pistil extensin-like protein
TC155129	0,37	nucleotidyl transferase domain-containing protein
TC139157	0,37	mnd1-interacting protein 1-like
TC135510	0,20	u6 snrna-associated sm-like protein lsm7
<i>Regolazione biologica</i>		
TC128695	0,49	wrky10 transcription partial
TC125051	0,49	pppde peptidase domain-containing protein
TC133365	0,48	uncharacterized loc101211454
TC141276	0,46	protein
TC150298	0,44	rrna intron-encoded homing endonuclease
TC130779	0,37	protein b-cell receptor-associated 31-like protein
TC133624	0,36	f-box protein
TC159192	0,34	integrase
TC125309	0,39	pectin methylesterase
TC127809	0,29	nonclathrin coat protein zeta2-cop
TC154759	0,24	ring finger
<i>Riproduzione</i>		
TC136561	0,29	nifu-like protein chloroplastic-like
<i>Processi multicellulari</i>		
TC128044	0,32	delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase
<i>Processi di sviluppo</i>		
TC152711	0,49	cst complex subunit ten1-like isoform 1
TC135831	0,33	kinesin light
<i>Non caratterizzate</i>		
TC168113	0,50	---NA---
TC125737	0,49	---NA---
TC155777	0,47	protein
TC159781	0,45	---NA---

TC	FC	Geni
TC164302	0,37	---NA---
TC163041	0,33	---NA---
TC133685	0,31	---NA---
TC155133	0,30	---NA---
TC160764	0,29	---NA---
TC145892	0,29	---NA---
TC149404	0,29	---NA---